

**Eisen(III)-Komplexe und Untersuchung
ihrer Eigenschaften als Enzymmimetika
für Katalasen und Peroxidasen**

DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im
Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen**

vorgelegt von

Thorsten Kettler-Thiel

geboren am 11.7.1974 in Essen

Essen 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis April 2007 am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann angefertigt.

Eingereicht am: 18.7.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2007

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

"Hiermit bestätige ich, die Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben."

Thorsten Kettler-Thiel

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann danke ich für das interessante interdisziplinäre Thema dieser Arbeit, sein stets gezeigtes Interesse und die zahlreichen anregenden Diskussionen während der Durchführung sowie für die großzügige Unterstützung mit Institutsmitteln.

Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot danke ich für die Übernahme des Korreferates sowie für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis im Rahmen der Kooperation die Peroxidaseaktivitäten meiner TAA-Fe(III)-Komplexe untersuchen zu können.

Herrn Prof. Dr. Mathias Ulbricht danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Frau Dr. U. Rauen danke ich für die Untersuchungen der biologischen Aktivitäten meiner TAA-Liganden, für die gute Zusammenarbeit, sowie für die konstruktiven Diskussionen während meiner Promotion im Rahmen der Kooperation bei allen biochemischen Fragestellungen.

Herrn Dipl.-Ing. Heinz Bandmann und Herrn Dr. Torsten Schaller danke ich für die stets freundliche Unterstützung bei allen NMR-Spektroskopischen Fragestellungen.

Herrn Klaus Kowski danke ich für die Unterstützung bei technischen Problemen aller Art.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Institutes für Organische Chemie für die Kollegialität und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Frau Elisabeth Verheggen, Frau Helma Kallweit und Frau Pia Mereu für ihre hervorragende Mitarbeit sowie Herrn Dr. Hans-Gert Korth für die stets gewährte Hilfe bei den ESR-Messungen und seine Diskussionsbereitschaft.

Dank aussprechen möchte ich auch allen Mitgliedern des Institutes für Physiologische Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Kooperation. Frau Birgit Lammers, Frau Eva Hillen und Frau Natalie Boschenkov möchte ich für die Bereitstellung der benötigten Zellen danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines Studiums finanziell und moralisch unterstützt haben.

Meiner lieben Frau Bianca, die immer geduldig, unterstützend und vor allem aufbauend während meiner Promotion und der Anfertigung der Dissertation an meiner Seite stand.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Sauerstoffmetabolismus und Generierung von ROS.....	2
1.2	Schutzmechanismen.....	4
1.2.1	Nicht enzymatischer Schutz	4
1.2.2	Enzymatischer Schutz.....	5
1.2.2.1	Katalase	5
1.2.2.2	Peroxidase (POD)	8
1.3	Komplexierung als Schutz.....	9
1.4	Entwicklung von Katalasemimetika.....	11
1.4.1	Definition	11
1.4.2	Historischer Überblick	12
1.4.2.1	Porphyrin Eisen-Komplexe als Enzymmimetika	13
1.4.2.2	Makrozyklische Nicht Porphyrin Eisen-Komplexe	16
1.4.2.3	Nicht-makrozyklische Eisen-Komplexe als Katalysatoren	18
1.4.2.4	Nachweis der katalasemimetischen Reaktion	21
1.4.3	Betrachtung der Mimetika als Enzyme ohne Protein.....	22
2	PROBLEMSTELLUNG	24
3	PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG	26
3.1	Darstellung der offenkettigen Liganden.....	27
3.1.1	Templat-Synthesen der Liganden	28
3.1.2	Synthese per Schutzgruppenchemie.....	31
3.1.3	Synthese der Methylamino-Liganden	34
3.1.3.1	Komplexierung der Methylaminoliganden	41
3.1.4	Synthese der Liganden 15, 17, 24 mittels 2-Aminobenzaldehyd.....	43
3.1.4.1	Komplexierung der Aminoliganden.....	46
3.1.5	Synthese der Pyrrol-Liganden	48
3.1.5.1	Synthese der Eisen(III)-Komplexe der Pyrrol-Liganden	50
3.1.6	Synthese der Picolinsäureamid-Liganden	55

3.1.6.1	Synthese der Eisen(III)-Komplexe der Picolinsäureamid-Liganden.....	57
3.2	Synthese der TAA- Liganden	64
3.2.1	Synthese von Propinal nach Sauer ^[65]	65
3.2.2	Synthese von 5,6-Diamino-2,2-diphenylbenz-1,3-dioxol	65
3.2.3	Zyklisierung	67
3.2.3.1	Synthese der Eisen(III)-Komplexe	68
3.3	Syntheseversuch weiterer TAA-Liganden.....	70
3.3.1	Synthese von 2,3-Phenazindiamin	70
3.3.2	Versuch der Zyklisierung mit Propinal und 2,3-Phenazindiamin	71
4	UNTERSUCHUNGEN DER KOMPLEXE AUF ENZYMATISCHE AKTIVITÄT.....	72
4.1	Untersuchung auf Katalase - Aktivität.....	72
4.1.1	Sauerstoffmessungen mittels Clark Elektrode.....	72
4.1.1.1	Aufbau und Funktion der Clark-Elektrode	73
4.1.1.2	Kalibrierung der Clark-Elektrode	74
4.1.1.3	Ergebnisse der Sauerstoff-Messungen	75
4.2	Untersuchung auf Peroxidase – Aktivität	77
4.2.1	Untersuchungen mit 1,2-Phenylendiamin.....	77
4.2.2	Untersuchungen mit Amplex Red ^[71]	89
4.2.3	Untersuchungen mit Luminol ^[73, 74]	99
5	UNTERSUCHUNGEN IM ZELLULÄREN SYSTEM	101
5.1	Untersuchungen per ESI-Massenspektrometrie.....	101
5.2	Untersuchungen mittels Sauerstoffmessungen.....	104
6	ZUSAMMENFASSUNG	111

7	EXPERIMENTELLER TEIL:	115
7.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	115
7.1.1	Verwendete Geräte	115
7.1.2	Verwendete Chemikalien	117
7.1.3	Trocknung der Lösungsmittel / Vorbereitung der Chemikalien	121
7.2	Versuchstiere für Zellmessungen	122
7.3	Synthese der Verbindungen	123
7.3.1	Synthese der Diamin-Vorstufen	123
7.3.1.1	2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol ^[55, 56]	123
7.3.1.2	2,2-Dimethyl-5-nitro-1,3-benzdioxol ^[56]	124
7.3.1.3	2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-1,3-benzdioxol ^[56]	125
7.3.1.4	2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin (Variante 1) ^[56]	126
7.3.1.5	2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin (Variante 2) ^[50]	127
7.3.1.6	4,5-Dinitro-benz-1,2-diol ^[56]	128
7.3.1.7	5,6-Dinitro-2,2-diphenyl-1,3-benzdioxol ^[30, 77]	129
7.3.1.8	2,2-Diphenyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin	130
7.3.1.9	2,3-Phenazindiamin ^[66, 67]	131
7.3.2	Synthese der Aldehyde	134
7.3.2.1	2-(2'-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (Analog Lit. ^[49])	134
7.3.2.2	2-(2'-Aminophenyl)-1,3-dioxolan ^[50]	136
7.3.2.3	2-(2'-N-FMOC-aminophenyl)-1,3-dioxolan (Analog Lit. ^[51])	138
7.3.2.4	N-FMOC-2-aminobenzaldehyd (Analog Lit. ^[52])	140
7.3.2.5	2-(Methylamino)-benzylalkohol (Analog Lit. ^[47])	141
7.3.2.6	2-(Methylamino)-benzaldehyd ^[47]	143
7.3.2.7	2-Aminobenzaldehyd ^[59]	144
7.3.2.8	Propinal ^[65]	146
7.3.3	Templat - Synthesen	148
7.3.3.1	N,N'-Bis(2'-nitrobenzyliden)-1,2-phenylendiamin (Analog Lit. ^[79]) ^[34]	148
7.3.3.2	N,N'-Bis(2'-nitrobenzyliden)-1,2-ethylendiamin ^[47]	150
7.3.3.3	N,N'-1,2-Ethylen-bis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II) ^[47]	151
7.3.3.4	N,N'-1,2-Phenylenbis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II) (Analog Lit. ^[48])	153

7.3.3.5	Entmetallisierung von N,N'-1,2-Ethylenbis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II) (Analog Lit. ^[48])	155
7.3.3.6	Entmetallisierung von N,N'-1,2-Phenylenbis-(2-aminobenzyliden-iminato)-nickel(II) (Analog Lit. ^[48])	156
7.3.4	FMOC-geschütztes Amphen	157
7.3.4.1	N,N'- Bis-(2'-FMOC-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamin	157
7.3.5	Methylamino-Liganden	158
7.3.5.1	N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]-1,2-ethylendiamin ^[46, 47]	158
7.3.5.2	N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]-1,2-phenylendiamin (Variante 1) ^[46]	159
7.3.5.3	N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]-1,2-phenylendiamin (Variante 2) (Analog Lit. ^[46, 54])	160
7.3.5.4	N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]-2,2-dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin (Variante 1 Analog Lit. ^[46])	163
7.3.5.5	N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]- 2,2-dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin (Variante 2) (Analog Lit. ^[46, 54])	164
7.3.6	Amino-Liganden	167
7.3.6.1	N,N'Bis-[2'-aminobenzyliden]-1,2-ethylendiamin ^[46, 47]	167
7.3.6.2	N,N'-Bis-(2'-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamin (Variante 1) ^[46]	168
7.3.6.3	N,N'-Bis-(2'-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamin (Variante 2) (Analog Lit. ^[46, 54])	169
7.3.6.4	N,N'-Bis-[1-(2-amino-phenyl)-methyliden]-2,2-dimethyl-benzo-[1,3]-dioxol-5,6-diamin (Variante 1 Analog Lit. ^[46])	172
7.3.6.5	N,N'-Bis-[1-(2-amino-phenyl)-methyliden]-2,2-dimethyl-benzo-[1,3]-dioxol-5,6-diamin (Variante 2) (Analog Lit. ^[46, 54])	173
7.3.7	Pyrrol-Liganden	176
7.3.7.1	N,N'-Bis-[1-(1H-pyrrol-2-yl)-methyliden]-1,2-phenylendiamin ^[46, 54]	176
7.3.7.2	2,2-Dimethyl-N,N'-bis-[1-(1H-pyrrol-2-yl)-methyliden]-benzo[1,3]dioxol-5,6-diamin (Analog Lit. ^[54]).....	179
7.3.8	Picolinsäureamid-Liganden	182
7.3.8.1	1,2-Bis(2-picolinsäureamido)-benzen ^[62]	182
7.3.8.2	5,6-Bis(2-picolinsäureamido)-benz-1,3-dioxol (Analog Lit. ^[62]).....	184

7.3.9	TAA-Liganden	187
7.3.9.1	5,14-Dihydro-dibenzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen ^[32]	187
7.3.9.2	2,2,12,12-Tetramethyl-5,14-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]-benzo[b,i]- 1,4,8,11-tetraaza[14]annulen	188
7.3.9.3	2,2,12,12-Tetraphenyl-5,15-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]-benzo[b,i]- 1,4,8,11-tetraaza[14]annulen	189
7.3.10	Darstellung der Eisen(III)-komplexe	191
7.3.10.1	Eisen(III)-dibenzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]-annulen-chlorid ^[30, 44]	191
7.3.10.2	Eisen(III)-2,2,12,12-tetramethyl-5,14-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]- benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen-chlorid	193
7.3.10.3	Eisen(III)-2,2,12,12-tetraphenyl-5,14-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]- benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen-chlorid	194
7.3.10.4	N,N'-Bis-(2'-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamineisen(III)-chlorid	195
7.3.10.5	N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]- 2,2-dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6- diamineisen(III)-chlorid	196
7.3.10.6	Komplexierung der Pyrrol - Liganden	197
7.3.10.7	Bis(pyridino)-eisen(III)-1,2-bis(2-picolinsäureamido)-benzen-perchlorat (Variante von Lit. ^[63])	201
7.3.10.8	Bis(pyridinino)-eisen(III)-5,6-bis(2-picolinsäureamido)-benz-1,3-dioxol- perchlorat (Variante von Lit. ^[63])	203
7.3.11	Synthesversuche weiterer Liganden	205
7.3.11.1	Zyklisierung von 2,3-Phenazindiamin und Propinal.....	205
7.4	Untersuchung der Eisen(III)-komplexe	206
7.4.1	ESR – Spektroskopie	206
7.4.2	Katalase – Aktivität.....	206
7.4.3	Peroxidase – Aktivität.....	208
7.4.3.1	1,2-Phenylendiamin ^[68]	209
7.4.3.2	Amplex Red ^[71]	210
7.4.3.3	Luminol ^[73, 74]	214

7.5	Zellversuche	215
7.5.1	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	215
7.5.2	Vorversuche zur Sauerstoffmessung mit Zelllysaten.....	215
7.5.3	Zellpräparation und Zellkultivierung.....	217
7.5.3.1	Präparation und Kultivierung von Rattenhepatozyten	217
7.5.3.2	Präparation für die Sauerstoffmessungen	218
7.5.3.3	Durchführung der Sauerstoffmessungen.....	219
7.5.3.4	Präparation für die ESI-Massenspektrometrie.....	220
8	LITERATUR	222

Abkürzungsverzeichnis

2-Nitroen	N,N'-Bis(2'-nitrobenzyliden)-1,2-ethylendiamin
Abb.	Abbildung
Abphen	N,N'-Bis(2'-aminobenzyliden)-o-phenylendiamin
abs.	Absolut
Amben	N,N'-Bis(2'-aminobenzyliden)-1,2-ethylendiamin
ATP	Adenosintriphosphat
CAT	Katalase
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EI	Elektronenstoßionisation
Em.	Emission
ESI	Elektrospray Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
et al.	und andere (lat. et alii)
Exc.	Anregung
FADH ₂	Flavinadenin-dinucleotid (reduzierte Form)
Fe8-HQ	Eisen(III)-bis-8-hydroxychinolin-Komplex
FMOC	9-Fluorenylmethylformiat
FMOC-Cl	9-Fluorenylmethylchlorformiat
Gl.	Gleichung
GOD	Glucose-Oxidase
h	Stunden
Häm	Ferriprotoporphrin IX
HBSS	Hanks' balanced salt solution (Hanks' gepufferte Salzlösung)
HEPES	2[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
HRP	Horseradish Peroxidase
IR	Infrarot
K	Kelvin
kDa	Kilodalton

KH	Krebs Henseleit Puffer
L	Liter
Lit.	Literatur
Luminol	5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion
M	molar (mol/L)
min	Minuten
MW	Molekulargewicht
NAD(P)H/H ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-(phosphat) (reduzierte Form)
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernresonanz)
p.a.	pro analyticum
Pa	Pascal
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
POD	Peroxidase
ppm	parts per million (Anteil pro 1000000)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
s	Sekunde
s.	siehe
Salen	N,N'-Bis(salicyliden)-1,2-ethyldiamin
Salophen	N,N'-Bis(salicyliden)-o-phenyldiamin
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOD	Superoxiddismutase
TAA	Tetraaza[14]annulen
Tab.	Tabelle
tert.	Tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TON	Umsatzzahl (Turn over number)
U/L	Einheiten pro Liter
UV/Vis	Ultraviolettes / sichtbares Licht
x g	Erdbeschleunigung
Zers.	Zersetzung

1 Einleitung

In biologischen Systemen werden durch die Metabolisierung des aufgenommenen Sauerstoffs die Energiemengen, die für den Lebenserhalt höherer Organismen notwendig sind, bereitgestellt. Dies geschieht durch exergone Redoxreaktionen, über die energiereiche Verbindungen, wie das Adenosintriphosphat (ATP), bereitgestellt werden. Als Reduktionsäquivalente für die Biosynthesen oder als Energielieferanten können NADH/H^+ und FADH_2 dienen, die durch die Oxidation von Nahrung im Citratzyklus oder der Glykolyse freigesetzt werden.^[1, 2]

Bei diesen stark exergonen Prozessen von Sauerstoff mit organischen Verbindungen bestehen jedoch auch Gefahren für die Zelle. So kann es bei der Reduktion des Sauerstoffs zur Freisetzung von radikalischen Zwischenstufen kommen, deren hohe Reaktivität zu unkontrollierten Oxidationen von zellulären Verbindungen mit weitreichenden Folgen führen kann. Durch eine Ein-Elektronenreduktion molekularen Sauerstoffs wird so das Superoxid-Radikalanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) gebildet. Zwei dieser Radikalanionen können durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgesetzt werden. Wasserstoffperoxid ist im Normalfall nur wenig reaktiv und sein zell- und gewebeschädigendes Potential ist eher gering, da es durch die Katalase (CAT) zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden kann. Andererseits ist das Wasserstoffperoxid aber auch nicht ungefährlich für die Zellen, da es über die Fenton-Reaktion^[3] in Gegenwart von Eisen(II)- oder anderen Übergangsmetall-Ionen durch eine weitere Ein-Elektronenreduktion in ein Hydroxid-Ion und ein Hydroxyl-Radikal (OH^{\bullet}) gespalten werden kann. Das Hydroxyl-Radikal gehört ebenso wie Wasserstoffperoxid und das Superoxid-Radikalanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) zu den reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* **ROS**) und wird wegen seiner hohen Reaktivität als Ursache von verschiedenen Krankheiten diskutiert. Die ROS besitzen zwar teilweise physiologische Funktionen, sind jedoch unter bestimmten Bedingungen auch an einer Vielzahl zell- und gewebeschädigender Prozesse beteiligt. In gesunden Organismen werden die empfindlichen Zellstrukturen durch die Freisetzung natürlicher Enzyme geschützt. Diese Enzyme bauen die reaktiven Sauerstoffspezies ab.^[4]

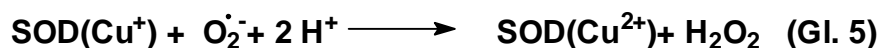
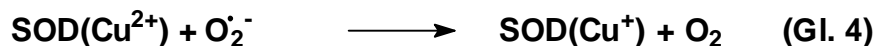
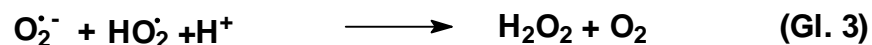
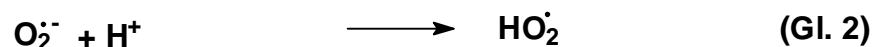
1.1 Sauerstoffmetabolismus und Generierung von ROS

In der Atmungskette wird molekularer Sauerstoff mittels enzymatischer Reduktion durch mehrere Oxidoreduktasen in Wasser überführt. Die hierzu benötigten Elektronen und Protonen werden von NADH/H⁺ und FADH₂ geliefert. Bei der Reaktion handelt es sich formal um die stark exergone Reaktion von Sauerstoff und Wasserstoff unter Bildung von Wasser (Gl. 1), die auch als Knallgas-Reaktion bekannt ist.

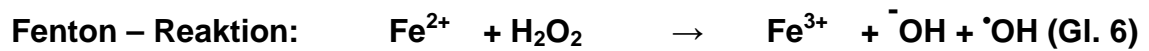


In den Mitochondrien verläuft die Reaktion allerdings über eine Kaskade von Oxidoreduktasen mit unterschiedlichen Redoxpotentialen, wodurch Elektronen und Protonen kontrolliert auf den Sauerstoff übertragen werden. Die im Verlauf dieses Elektronen- und Protonentransportes freigesetzte Energie wird über die ATP-Synthese in Form von ATP gespeichert.^[1]

Allerdings werden durch Übertragung von einem Elektron auf ein Sauerstoffmolekül etwa 1-2% des mitochondrial umgesetzten Sauerstoffs unter Bildung von Superoxid-Radikalanionen (O₂^{•-}) reduziert und freigesetzt.^[5] Reichweite und Membranpermeabilität sind stark begrenzt, da es eine große Polarität und eine niedrige Halbwertszeit besitzt. Durch spontane Dismutation (Gl. 2+3) oder enzymatische Reduktion über die SOD (Gl. 4+5 schematische Darstellung am Beispiel einer Cu/Zn-SOD) wird daraus Wasserstoffperoxid gebildet.



Dieses ist zwar stabiler als das Superoxid-Radikalanion, es kann aber durch die katalytische Wirkung von Eisen(II)- oder anderen Übergangsmetallionen, wie z.B. Cu^+ , über die Fenton-Reaktion^[3] (Gl. 6) in das äußerst reaktive, aber kurzlebige Hydroxylradikal (OH^\bullet) umgewandelt werden, das unmittelbar am Entstehungsort zu Zellschädigungen führt.



Die Fenton Reaktion ist jedoch nicht der einzige Weg, über den die gefährlichen Hydroxylradikale gebildet werden. Sie können nämlich auch über die Haber-Weiss-Reaktion^[6] aus Superoxidradikalanionen gebildet werden. Dabei läuft die Fenton-Reaktion (Gl. 6) ab, bei der ein Eisen(II)-Ion durch H_2O_2 zu Eisen(III) oxidiert und ein Hydroxylradikal gebildet wird (Abb. 1 links). Das Eisen(III) reagiert mit einem Superoxidradikalanion unter Bildung von Triplett-Sauerstoff zurück zum Eisen(II) (Abb. 1 rechts).

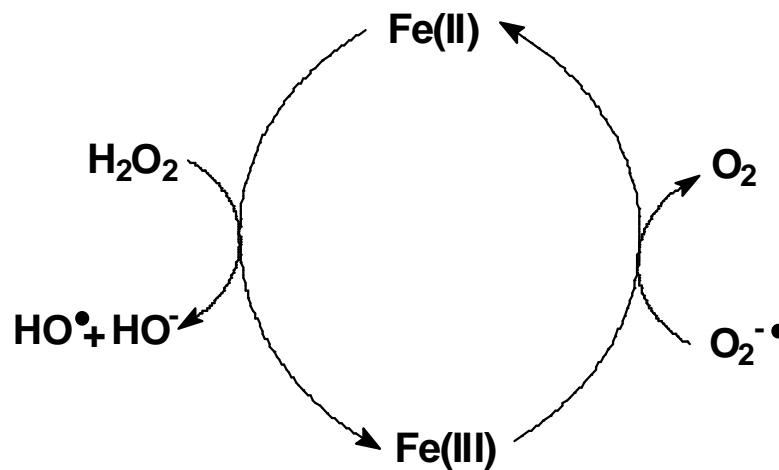


Abb. 1: Haber-Weiss-Reaktion^[6]

Die Atmungskette in den Mitochondrien stellt also den Hauptbildungsort für **ROS** da, jedoch werden **ROS** auch auf anderem Wege freigesetzt. So werden beispielsweise beim Abbau von Nucleotiden mittels Xanthin-Oxidase Superoxidradikalanionen freigesetzt.

Die Menge von **ROS** in der Zelle hängt daher zum einen von ihrer Stoffwechselintensität, die sich im Elektronenfluss manifestiert und zum anderen von der Anwesenheit fentonreaktiver Metalle ab. Diese Reaktionen beeinflussen daher auch das Ausmaß an Schäden, die die reaktiven Sauerstoffspezies auslösen.

Ein gewichtiger Grund hierfür ist vermutlich, dass ein intaktes Gleichgewicht zwischen Oxidation und Reduktion gestört wird. Lipide können zum Beispiel durch Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren und Proteinen zerstört werden.^[7] Um diesen und anderen oxidativen Schäden vorzubeugen, besitzt der Körper eine Vielzahl an Schutzmechanismen.

1.2 Schutzmechanismen

Organismen haben sich im Laufe der Evolution immer besser an die Sauerstoffatmosphäre angepasst und gegen seine zytotoxischen Wirkungen eine große Anzahl von Schutzmechanismen entwickelt. Zellen zeigen zahlreiche präventive Schutzvorkehrungen, das heißt Mechanismen, die die Radikale möglichst schnell entschärfen bzw. die Entstehung inhibieren.^[7] Man kann die bereits erwähnten Schutzmechanismen in enzymatischen und nicht enzymatischen Schutz unterteilen.

1.2.1 Nicht enzymatischer Schutz

Unter nicht enzymatischem Schutz versteht man Schutzmechanismen durch im menschlichen Körper vorhandene Vitamine, wie z. B. Ascorbat (Vitamin C), β -Carotin (Vitamin A) und α -Tocopherol (Vitamin E). Diese können gezielt mit Radikalen reagieren und weniger reaktive Radikale bilden, die schließlich wieder reduziert werden können bzw. disproportionieren, ohne Schaden anzurichten.

1.2.2 Enzymatischer Schutz

Ein weiterer Schutzmechanismus ist der enzymatische Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies. Wie bereits erwähnt wird das Superoxidradikal-Anion durch die Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid und Triplett-Sauerstoff umgewandelt (Gl. 4+5). Das so gebildete Wasserstoffperoxid kann dann entweder durch die Katalase zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt werden oder durch die Peroxidase unter Oxidation anderer Substrate zu Wasser reduziert werden. Auf die letzten beiden Enzyme wird nun näher eingegangen.

1.2.2.1 Katalase

Die Katalase als Enzym, das im Organismus für einen kontinuierlichen Wasserstoffperoxid-Abbau verantwortlich ist, ist zum ersten Mal 1900 von Loew erkannt worden.^[8, 9] Erst 1923 stellte sich heraus, dass es sich bei dem Zentralatom im aktiven Zentrum um Eisen handelt.^[9] 1981 wurde die erste Kristallstruktur der Rinderleberkatalase, bei der Protoporphyrin IX als aktive Gruppe nachgewiesen werden konnte, veröffentlicht.^[9] Momentan sind die Sequenzen von über 80 reinen Katalasen, 16 Katalasen-Peroxidasen und mehrerer Mangankatalasen bekannt. Die Struktur einer der insgesamt 4 identischen Untereinheiten der Rinderleberkatalase ist in Abb. 2 dargestellt. Zu sehen sind die Struktur des Enzyms (Abb. 2 links) und eine vergrößerte Darstellung des aktiven Zentrums, in dem das Eisen als Zentralatom an ein Protoporphyrin und ein Tyrosinat koordiniert ist (Abb. 2 rechts).^[4]

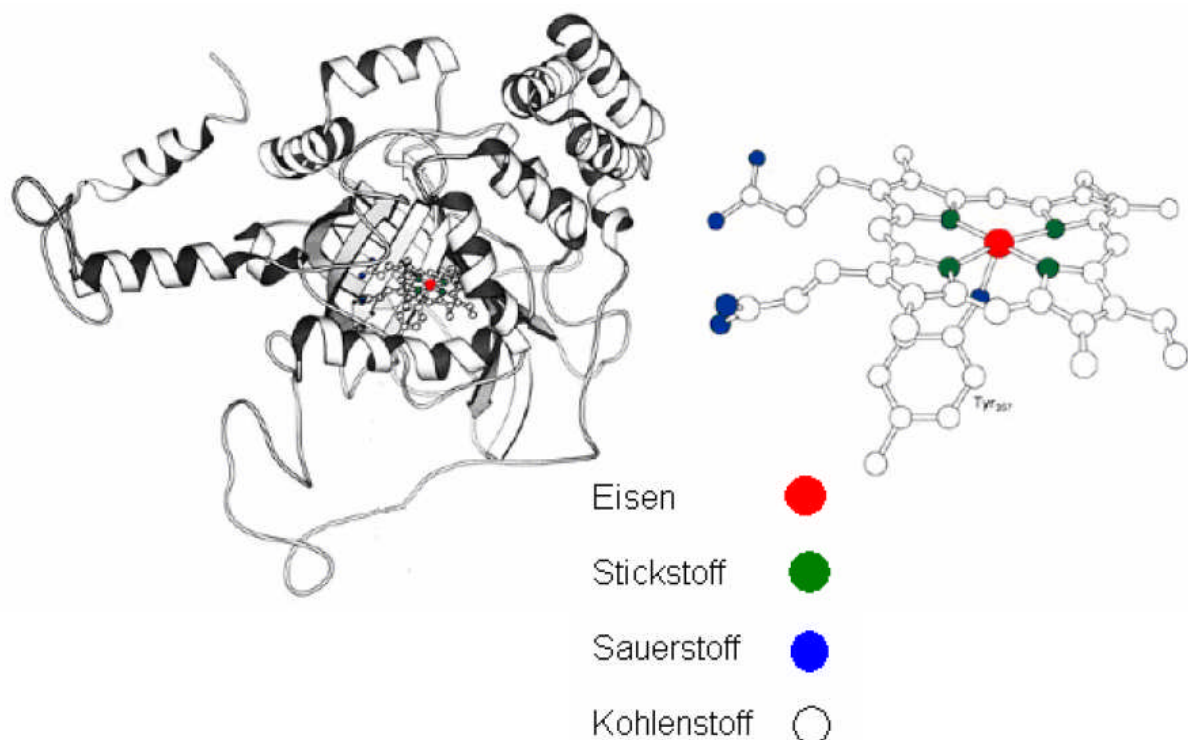


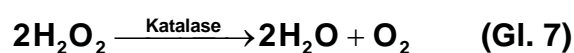
Abb. 2: Struktur einer Untereinheit der Katalase mit der Hämgruppe des aktiven Zentrums (aus Rinderleber)^[4]. Die Katalase besteht aus insgesamt 4 identischen Untereinheiten.

Die Einteilung der existierenden Katalasen erfolgt nach Goldberg und Hochmann in folgende drei Klassen: typische Katalasen (Häm-enthaltend), atypische Katalasen (kein Häm-enthaltend) und Katalase-Peroxidasen (Häm-enthaltend).^[9]

In den weiteren Abschnitten wird hauptsächlich auf die Gruppe der typischen Katalasen eingegangen. Obwohl auch hier verschiedene Primärstrukturen entdeckt wurden, bleiben die Tertiär- und Quartär-Struktur weitgehend erhalten.

Die Katalase-Enzyme mit einer Molekülmasse von 220 bis 350 kDa bestehen aus vier Untereinheiten, deren aktives Zentrum jeweils eine Hämgruppe enthält.

Katalase disproportioniert Wasserstoffperoxid ohne Bildung freier Radikale zu Sauerstoff und Wasser:



Die katalytische Aktivität der Katalase ist bemerkenswert hoch und hat einen Wert von $k_{\text{Kat}} = 10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Es erfolgen 200.000 Katalysezyklen pro Sekunde und aktivem Zentrum.^[10]

Der einfache Katalasezyklus ist in Abb. 3 dargestellt.

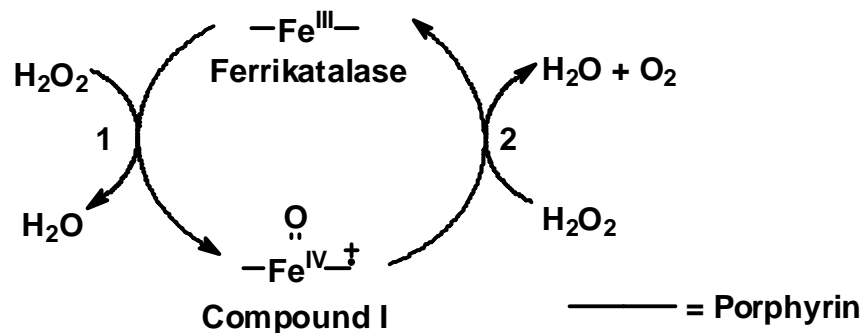


Abb. 3: Einfacher Katalasezyklus

In der Reaktion 1 in diesem Zyklus unterliegt die Ferrikatalase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid einer Zwei-Elektronen-Oxidation am katalytischen Zentrum und reagiert zum aktiven Oxidans (Compound I). Das Eisen-Zentralatom wird hierbei von der Oxidationsstufe +III zur Oxidationsstufe +IV und der Porphyrin-Ring zum Radikal-Kation oxidiert.

Compound I kann nun in einer Zwei-Elektronen-Reduktion mit einem weiteren Molekül Wasserstoffperoxid unter Bildung von Sauerstoff im Grundzustand (Singulett-Sauerstoff nicht nachweisbar) und Rückbildung der Ferrikatalase (Reaktion 2 in Abb. 3) reagieren.^[11] Die Gesamtstöchiometrie entspricht somit der Gl. 7.

Der Mechanismus des Wasserstoffperoxid-Abbaus durch Mangan-Katalasen ist aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Zentralatomen (zwei Mangan-Ionen im aktiven Zentrum) nicht analog dem Ferrikatalase-Mechanismus. Jedoch sind die Mangan-Katalasen noch nicht so genau untersucht und erst wenige Vertreter dieser Stoffklasse vollständig charakterisiert, daher kann hier noch keine definitive Aussage zum Mechanismus getroffen werden. Sie wurden bislang in Milchsäurebakterien und thermophilen Organismen entdeckt und liegen meist in oligomeren Strukturen als Homopentamere oder Homohexamere vor. In eukaryotischen Zellen kommen sie jedoch nicht vor.^[9] Daher werden sie in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

1.2.2.2 Peroxidase (POD)

Die Peroxidasen sind in der Tier- und Pflanzenwelt allgegenwärtig. Die pflanzlichen Peroxidasen enthalten in der Regel Ferriprotoporphyrin IX (Häm) als prosthetische Gruppe mit einem Histidin-Rest an der 5. Koordinationsstelle und oxidieren die verschiedensten Substrate unter Reduktion von Wasserstoffperoxid. Sie zeichnen sich durch eine sehr hohe Zahl multipler Enzymformen und durch eine außerordentliche Spannbreite der Substrate aus. Da ihre Katalysen häufig von auffälligen Farbreaktionen begleitet werden, wurden bereits 1855 die ersten Peroxidaseaktivitäten beschrieben. Die Bezeichnung „Peroxidase“ wurde bereits 1898 durch Linossier vorgeschlagen. Inzwischen gehören diese Enzyme zu den am intensivsten und umfangreichsten untersuchten überhaupt.^[12]

Die am häufigsten untersuchte Peroxidase ist die Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase HRP). Sie wurde offiziell 1903 von Bach *et al.*^[13] entdeckt. Die Peroxidase ist in der Lage, sowohl Wasserstoffperoxid, als auch organische Peroxide und Hydroperoxide zu reduzieren, wobei jedoch andere meist organische Substrate **SH**, die als Wasserstoffdonoren dienen, durch Ein-Elektronen-Oxidationen oxidiert werden.

Der einfache Peroxidasezyklus der Häm-Peroxidasen ist in Abb. 4 dargestellt. Bei der Oxidation des Eisen(III)-Komplexes mit H_2O_2 bildet sich, wie bei der Katalase, ein Eisen(IV)-Porphyrinradikalkation (Compound I). Hierbei liegt nun das Eisen nicht mehr unterhalb des Porphyrinrings, sondern in der Ringebene (Abb. 4 Reaktion 1). Nun werden durch eine Ein-Elektronen-Übertragung vom zu oxidierenden Substrat **SH** auf das Porphyrinradikalkation Compound II und ein Radikal **S \cdot** gebildet (Abb. 4 Reaktion 2). In einer zweiten Ein-Elektronen-Reaktion kann nun der Compound II mit einem weiteren Substratmolekül reagieren. Hierbei wird das Eisen-Zentralatom von der Oxidationsstufe +IV auf die Oxidationsstufe +III reduziert, dabei wird sowohl Wasser abgespalten als auch ein weiteres Radikal **S \cdot** freigesetzt (Abb. 4 Reaktion 3). Das Eisen(III)-Zentralatom ist nun nur noch tetragonal-pyramidal koordiniert und befindet sich unterhalb der Ringebene. Der Grundzustand ist somit wieder hergestellt.

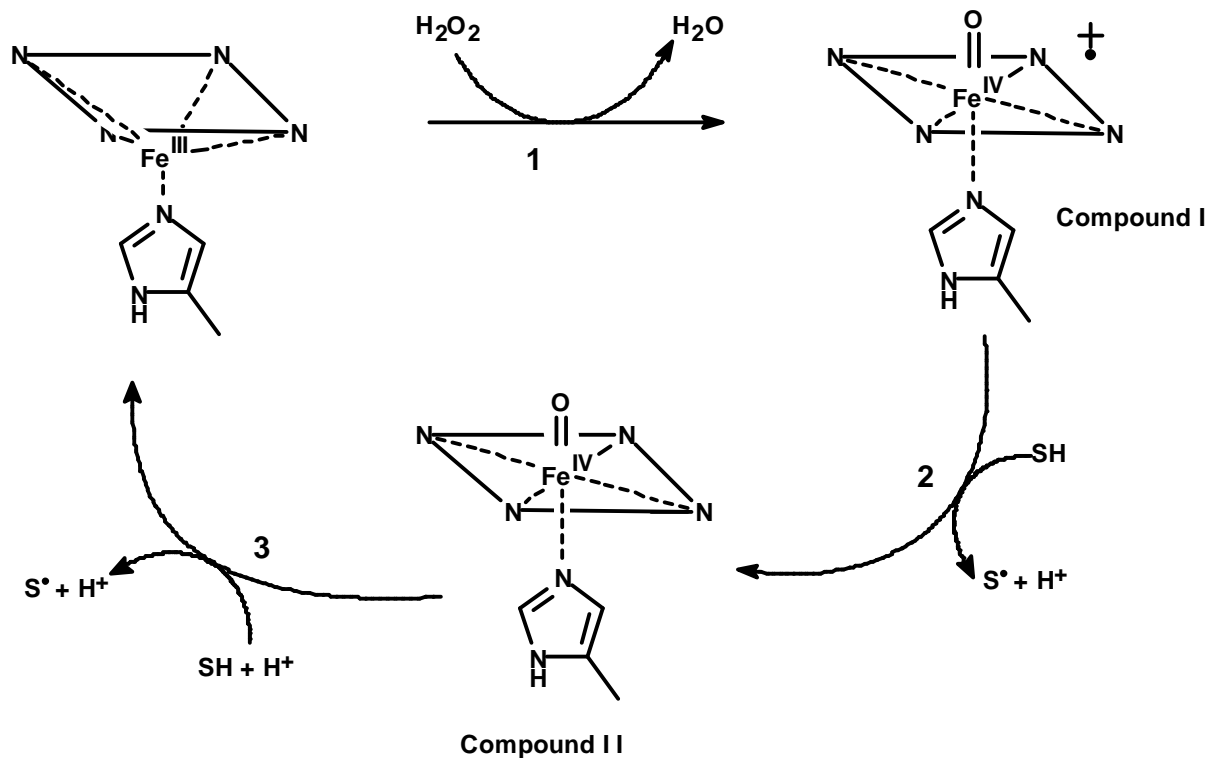
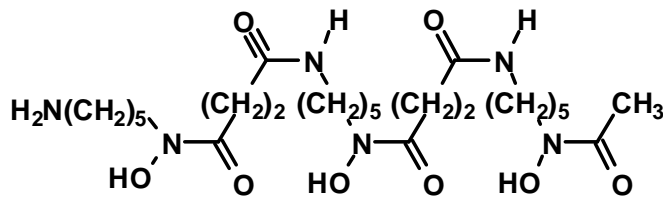
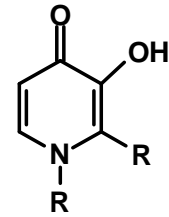
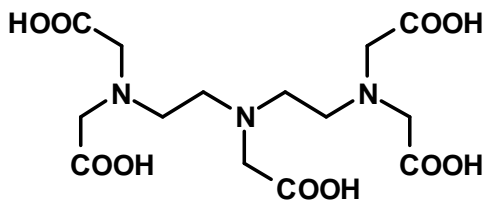
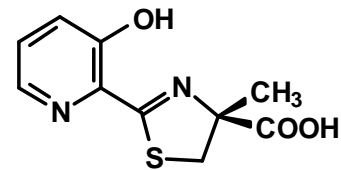


Abb. 4: Katalytischer Kreislauf der klassischen Peroxidase^[14]

Die Radikale S^\bullet können anschließend dimerisieren, disproportionieren, mit anderen Substratmolekülen reagieren, andere Moleküle angreifen und Kooxidationsreaktionen initiieren, molekularen Sauerstoff zum Superoxidradikalanion reduzieren oder ein Peroxylradikal bilden.^[15] Somit wird zwar H_2O_2 abgebaut, aber es werden teilweise auch neue reaktive Spezies gebildet, die dann wiederum enzymatisch oder nicht enzymatisch durch Antioxidanzien abgebaut werden müssen.

1.3 Komplexierung als Schutz

Ein weiterer Ansatz zur Verhinderung von eiseninduzierter Zellschädigung durch ROS ist es, die Konzentration an Eisenionen durch Komplexierung mit Liganden herabzusetzen und somit die Bildung von ROS über die Fenton-Reaktion und den Haber-Weiss-Prozess weitgehend zu verhindern. In der Medizin werden hierzu starke Eisenchelatoren, wie Desferal®, eingesetzt. Eine Auswahl, der in der Medizin verwendeten Chelatoren sind in Abb. 5 dargestellt.

DFO (Desferal) $\log k(\text{Fe}^{3+}) = 31$ HPO (3-Hydroxy-pyridin-4-on)
bei $\text{R}=\text{CH}_3$ $\log k(\text{Fe}^{3+}) = 15$ DTPA (Diethylenamin-pentaessigsäure)
 $\log k(\text{Fe}^{3+}) = 30$; $\log k(\text{Fe}^{2+}) = 16$;

DFT (Desferrithiocin)

Abb. 5: Beispiele von in der Medizin verwendeten Eisenchelatoren

Des Weiteren wurde versucht Liganden darzustellen, die durch intrazelluläre Komplexierung von Eisen-Ionen die Konzentration von unspezifisch gebundenem Eisen senken und dann zusätzlich die Funktion der Enzyme nachahmen und Wasserstoffperoxid möglichst quantitativ zersetzen. Hierdurch würden die entsprechenden Liganden doppelt protektiv wirken. Hierzu wurden zunächst die Porphyrine untersucht, da sie als prosthetische Gruppe der Katalase auch deren Wasserstoffperoxid disproportionierende Wirkung haben sollten.^[16] Zusätzlich wurde nach Enzymmimetika gesucht, die ebenfalls in der Lage sind ROS abzubauen.

1.4 Entwicklung von Katalasemimetika

1.4.1 Definition

Katalasemimetika sind sehr häufig in Veröffentlichungen im nicht physiologischen Milieu auf die jeweilige Katalyseaktivität hin untersucht worden. In dieser Arbeit sollen die Untersuchungen unter möglichst physiologischen Bedingungen erfolgen. In der folgenden Auflistung sind die Kriterien zusammengefasst, die zur Definition der Katalasemimetika eingesetzt werden sollen.

- a) Möglichst gleiche Stöchiometrie wie bei der nativen Katalase (Gl. 7)
- b) Messungen der Aktivitäten in wässrigem Milieu bei pH 7.2 - 7.4
- c) Katalytischer Abbau von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser bei physiologischen Konzentrationen
- d) Reaktionsmechanismus sollte möglichst ähnlich sein

Da die physiologische Konzentration von Wasserstoffperoxid im Organismus in einem Bereich von 10-20 μM anzusiedeln ist, werden die Messungen ebenfalls an dieses Konzentrationsfenster angepasst.^[17] Eine vollständige Angleichung des Reaktionsmechanismus unter Verwendung eines Mimetikums an die physiologische Zersetzung des Wasserstoffperoxids zu Sauerstoff erweist sich als kompliziert. Es sind bisher beim quantitativen Abbau von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff nicht alle mechanistischen Sachverhalte eindeutig aufgeklärt. Die Komplexverbindungen sollten im Plasma eine lange Verweilzeit besitzen. Darüber hinaus sind zusätzliche Anforderungen an den Eisenkomplex eine möglichst hohe Protektivität bzw. eine geringe Toxizität der Abbaukomponenten. Damit eine große Anzahl von Reaktionszyklen erreicht wird, sollte das Katalasemimetikum eine hohe Stabilität aufweisen.^[18]

1.4.2 Historischer Überblick

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Verbindungen hinsichtlich ihrer katalasemimetischen beziehungsweise ihrer wasserstoffperoxidzersetzenden Eigenschaften untersucht. Als einfachstes Modell wurden hierbei 1951 von Barb *et al.*^[19] die Reaktionen von hydratisierten Eisen(II)-Ionen, beruhend auf der katalytischen Wasserstoffperoxidzerstörung von Haber und Weiss^[6], betrachtet. Busch *et al.*^[20] beschrieben bei Untersuchungen von Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Salzen diese als effektive Katalysatoren bezüglich der Wasserstoffperoxid-Zersetzung bei einem pH-Wert < 2 . Sie haben dabei darauf hingewiesen, dass lediglich eine Tendenz zur Hydrolyse eine Messung im physiologischen pH-Bereich verhindert. Die Literaturdaten zeigen jedoch, dass man bei der Reaktion von H_2O_2 mit freiem Eisen (Fe^{2+} , Fe^{3+}) nicht von einem katalasemimetischen Verhalten sprechen kann^[19], da hierbei die in Abb. 6 dargestellten Reaktionen ablaufen, an denen freie Eisen(II)- bzw. Eisen(III)-Ionen direkt oder indirekt, da es sich um Folgereaktionen handelt, beteiligt sind. Dieser sogenannte „Free Radical“-Mechanismus^[20] weicht weit von dem in Abb. 3 dargestellten einfachen Mechanismus der Katalase ab. Des Weiteren sprechen auch die in der Literatur^[21-23] angegebenen Umsatzzahlen (TON, turn over number) von 0.25 - 0.8 gegen eine katalasemimetische Reaktion.

1. $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \text{HO}_2^\cdot$
 $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2 \text{H}^+ + \text{O}_2^{\cdot-}$
2. $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\cdot$
 $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{FeO}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$
3. $\text{FeO}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-}$
4. $\text{FeO}^{2+} + \text{RH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{R}^\cdot$
5. $\text{HO}^\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{R}^\cdot$
6. $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
7. $\text{HO}^\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2^\cdot$
 $\text{HO}^\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ + \text{O}_2^{\cdot-}$
8. $\text{Fe}^{2+} + \text{HO}^\cdot \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^-$
9. $\text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^\cdot \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}^+$
10. $\text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2^\cdot \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{Fe}^{3+}$
11. $\text{R}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}_2^\cdot$
12. $\text{Fe}^{2+} \text{RO}_2^\cdot \rightarrow \text{RO}_2^- + \text{Fe}^{3+}$

R = Substrat

Abb. 6: „Free Radical“- Mechanismus zur H_2O_2 -Zersetzung durch hydratisierte Fe^{2+} - bzw. Fe^{3+} -Ionen^[20]

1.4.2.1 Porphyrin Eisen-Komplexe als Enzymmimetika

Es wurden systematische Studien an Eisen(III)-Systemen verschiedener Liganden durchgeführt. Das naheliegendste System besteht aus dem katalaseprosthetischen Eisen(III)-Protoporphyrin IX, das sich durch Abtrennung vom Protein der Katalase ergibt. Dieser Komplex zeigte erwartungsgemäß Wasserstoffperoxid zersetzende Eigenschaften, während das Protein ohne diese Einheit diese Eigenschaft nicht besitzt.^[16] Daher wurden hämhaltige Modelle meist für mechanistische Untersuchungen verwendet.

Bei der Untersuchung der Hämin Komplexe traten jedoch Probleme durch schlechte Wasserlöslichkeit, Alterung durch Autoxidation der Vinyl-Seitenketten im Porphyrin-Liganden und verstärkte Aggregation des Hämins in Lösung auf.^[24] Dies störte die Messungen insbesondere dadurch, dass die katalytische Aktivität vollständig auf der Aktivität des Hämin-Monomers beruhte. Das monomere Hämin (Abb. 7a) und Eisen(III)-Ionen (Abb. 7 b) zeigen in ihrer katalytischen Aktivität ähnliche pH-Abhängigkeiten, während die Aktivität der Katalase über weite Bereiche pH-unabhängig ist (Abb. 7 c).

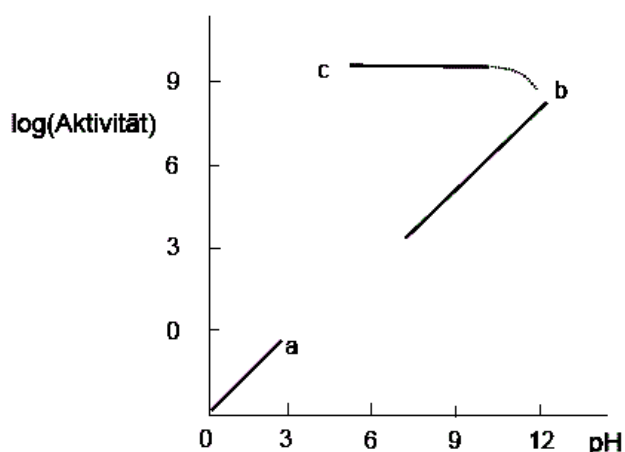
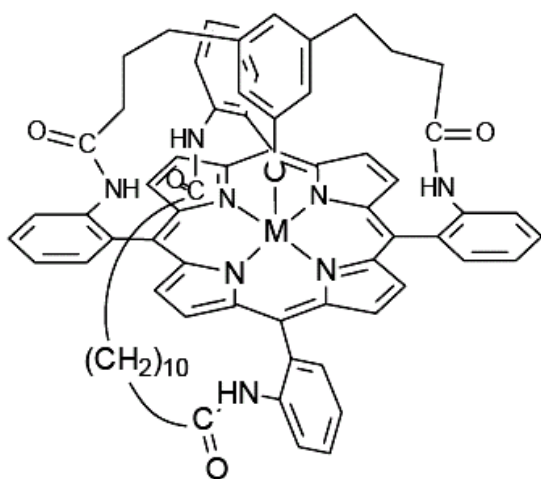


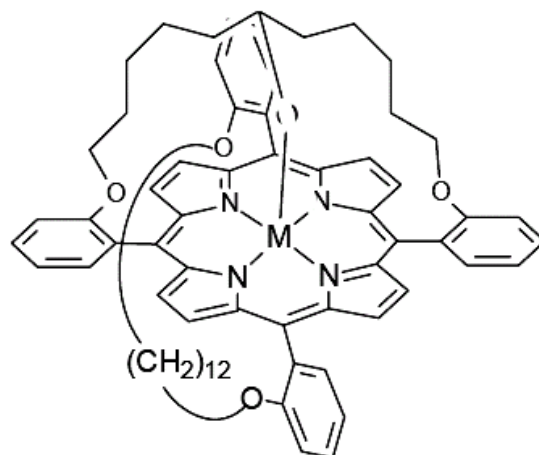
Abb. 7: Vergleich der spezifischen katalytischen Aktivität von Fe^{3+} -Ionen (a), Hämin (Monomer) (b) und Katalase (c) bei 0°C als Funktion des pH-Wertes.^[25]

Als Enzymmimetika für Ferri-Katalasen wurden daher überwiegend Eisen-Porphyrine untersucht, wobei diese jedoch meist nur zu mechanistischen Studien als Modellsysteme eingesetzt wurden. Die katalasemimetischen Untersuchungen der abgebildeten Porphyrin-Systeme **1-4** ergaben die in Tab. 1 dargestellten Aktivitäten und Umsatzzahlen (TON).^[26]

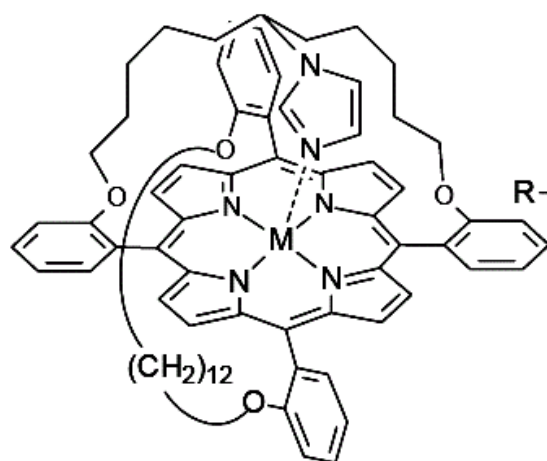
Auf Grund der geringen Wasserlöslichkeit der Komplexe **1-4** wurden hierbei die Messungen jedoch nicht in Wasser, sondern in Dichlormethan durchgeführt und ein Phasentransferkatalysator verwendet, um Wasserstoffperoxid in die organische Phase zu bringen. Hier kann nach der Definition nicht von einem Katalasemimetikum gesprochen werden, da es sich um ein nicht-wässriges System handelt und die Konzentrationen nicht im physiologischen Bereich liegen.



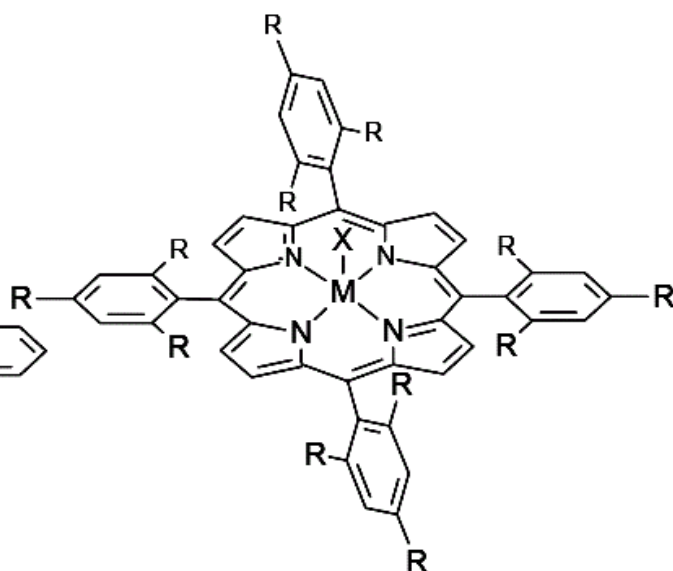
1



2



3



4

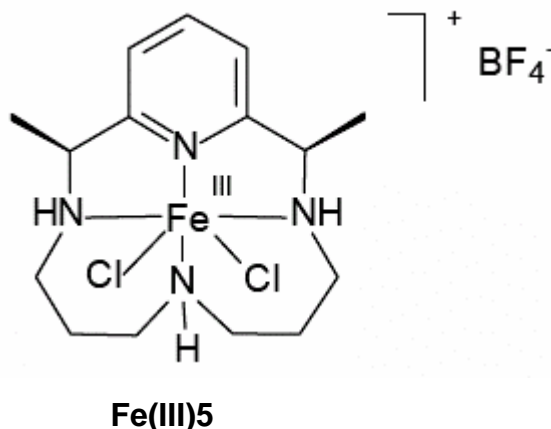
Tab. 1: Katalaseaktivität der Eisen-Porphyrine 1 – 4; [Katalysator] = 312 μM ; $[\text{H}_2\text{O}_2]$ = 214 mM
von Komplex 3 wurde nur der Mangan-Komplex untersucht

Komplex	1	2	3	4
Sauerstoffentwicklung in % (TON)	21 (71)	18 (64)	-	10 (33)

1.4.2.2 Makrozyklische Nicht Porphyrin Eisen-Komplexe

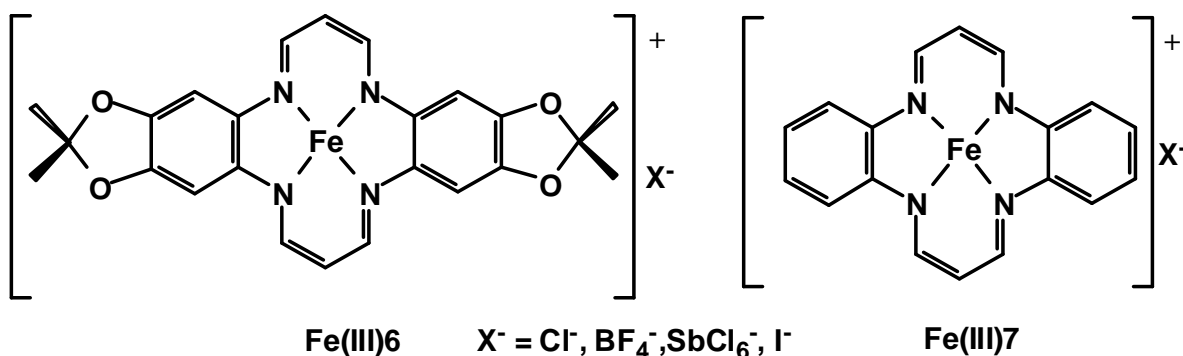
Außer den häm-haltigen Makrozyklen wurden auch noch nicht häm-haltige Makrozyklen als Modelle für mechanistische Untersuchungen dargestellt und hinsichtlich ihrer katalasemimetischen Eigenschaften untersucht.

So wurde in saurer gepufferter Lösung der Eisen(III)-komplex **Fe(III)5** als Komplex mit katalase- und peroxidasemimetischen Eigenschaften beschrieben.^[20, 27]



Diese Untersuchungen wurden von Busch *et al.*^[20] bei Konzentrationen von Wasserstoffperoxid und **Fe(III)5** im millimolaren Bereich durchgeführt. Studien, die im Arbeitskreis Sustmann bei physiologisch relevanten mikromolaren Konzentrationen von **Fe(III)5** und Wasserstoffperoxid durchgeführt wurden, zeigten ein anderes Bild. Bei diesen geringen Konzentrationen war die Bildung von Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid lediglich eine unbedeutende Nebenreaktion. Bei dem physiologischen pH 7.2 konnte keine Sauerstoffbildung, sondern lediglich die Zersetzung des Liganden festgestellt werden.^[28, 29]

Ein weiterer Vertreter der makrozyklischen Katalasemimetika ist im Arbeitskreis Sustmann entwickelt worden. Hierbei handelt es sich um den Tetraaza[14]-annulen-Komplex **Fe(III)6**^[30, 31], der auf dem Grundgerüst von Hiller *et al.*^[32] **Fe(III)7** basiert.



Dieser in unserem Arbeitskreis entwickelte Komplex **Fe(III)6** zeigte bei der Zersetzung von H_2O_2 bei pH 7.2, 25°C in einem 50 mM Phosphatpuffer einen guten Umsatz des Wasserstoffperoxids zu Sauerstoff. Die Sauerstoffentwicklung wurde hierbei mittels einer Clark-Elektrode kontinuierlich während der Reaktion beobachtet. Der Komplex zeigte unter annähernd physiologischen Bedingungen eine Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff in guter Näherung zu der Katalasestöchiometrie (Gl. 7) und eine Sauerstoffausbeute von 87 %. Es konnte davon ausgegangen werden, dass neben der Katalasereaktion auch noch die Peroxidasereaktion ablief (s. Kapitel 1.4.3), da durch Zugabe von Katalase nachgewiesen wurde, dass das H_2O_2 vollständig verbraucht wurde. Somit kann hier von einem Katalasemimetikum gesprochen werden, jedoch musste der Komplex aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit noch in DMSO vorgelöst werden.

Sowohl der Ligand **6** als auch der Komplex **Fe(III)6** wurden in Zellversuchen hinsichtlich der protektiven Wirkung gegen kälteinduzierte Zellschädigung, die stark Eisen und ROS abhängig ist, eingesetzt.^[33] Hierbei zeigte der freie Ligand eine deutlich höhere Protektivität als dieselbe Menge an Komplex **Fe(III)6**. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass intrazelluläres Eisen durch **6** komplexiert und **Fe(III)6** durch Oxidation gebildet wird. Der Komplex kann dann als Katalasemimetikum wirken. Daher wirkt der Ligand der Bildung von Hydroxylradikalen durch Abfangen von „freiem“ Eisen und H_2O_2 entgegen. Die Überprüfung dieser Hypothese war ebenfalls Teil dieser Arbeit.

Liganden dieser Art wurden noch durch verschiedene Seitengruppen variiert, um die Wasserlöslichkeit oder die Sauerstoffausbeute zu erhöhen.

1.4.2.3 Nicht-makrozyklische Eisen-Komplexe als Katalysatoren

Es wurden bereits eine Reihe nicht-makrozyklischer Liganden mit Stickstoff und Sauerstoff als Donatoratome auf ihre katalasemimetische Aktivität hin untersucht.^[34, 35] Viele dieser Verbindungen sind bekannte Eisen-Chelatoren. So ist Eisen(III)-Ethyldiamin-*N,N,N',N'*-tetraacetat (Eisen(III)-EDTA) bei pH 9.0 – 10.5 ein effektives Katalasemimetikum, während es bei niedrigeren, d.h. auch physiologischen pH-Werten jedoch neben der Sauerstoffentwicklung auch zur Zersetzung des Liganden in Kohlendioxid und Ammoniak kommt, wobei das Eisen als Hydroxid ausfällt. Sind außerdem noch organische Substrate anwesend, so wird das System noch komplexer, da auch deren Oxidation möglich ist und somit die Geschwindigkeit der Wasserstoffperoxid-Zersetzung verändert wird. Die pH-abhängige Reaktion von Fe(III)-EDTA mit H₂O₂ ist in Abb. 8 dargestellt.^[36]

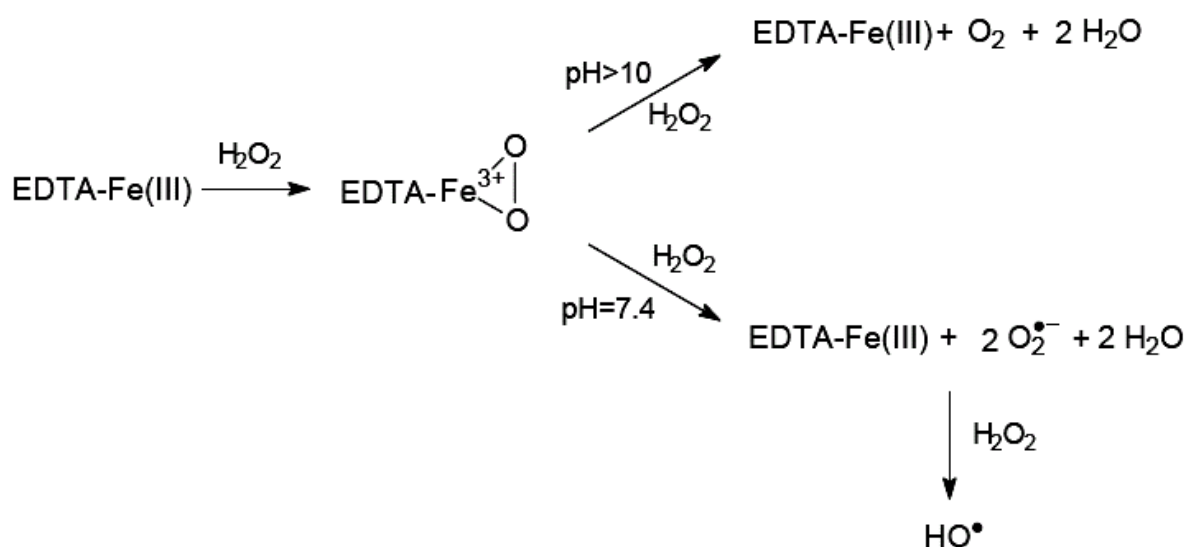
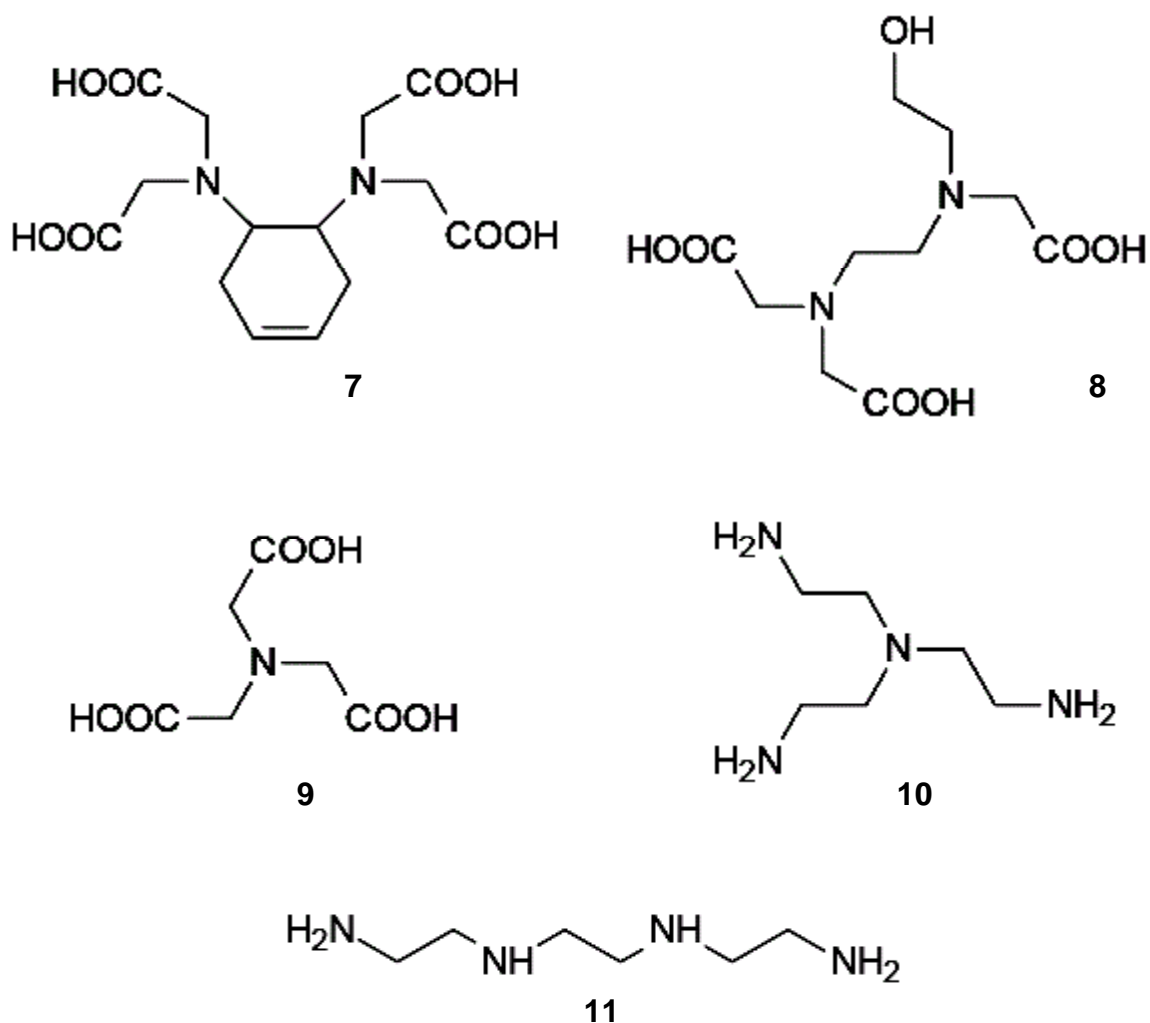


Abb. 8: pH-abhängige Reaktion von Fe(III)-EDTA mit H₂O₂^[36]

Weitere beschriebene Eisen(III)-Liganden sind Cyclohexendiamintetraessigsäure **7**, *N*-Hydroxyethylethyldiamintriessigsäure **8** und Nitrilotriessigsäure **9**. Die daraus erhaltenen Eisen(III)-Komplexe zeigen ebenfalls wasserstoffperoxidzersetzende Eigenschaften bei ähnlichen pH-Werten wie der EDTA-Komplex, ihr kinetisches Verhalten ist jedoch wesentlich komplizierter.^[20]



Ein weiterer Katalysator bei pH 10 ist der Eisen(III)-Komplex mit Triethylentetraamin **11** (Abb. 9). Vier der oktaedrischen Orbitale von Fe(III) werden durch das Tetraamin besetzt. Die beiden übrigen Orbitale werden zur Koordination mit Hydroxid- oder Hydroperoxid-Ionen verwendet. Die O-O-Bindung der in Abb. 9 unten rechts stehenden Verbindung ist zu kurz, um eine maximale Überlappung der bindenden d-Orbitale von Fe(III) mit beiden Sauerstoffatomen zu ermöglichen. Aufgrund dessen steht diese Bindung unter Spannung und macht die Verbindung gegenüber der Reaktion mit einem weiteren Molekül Wasserstoffperoxid unter Sauerstoffabspaltung reaktiver.

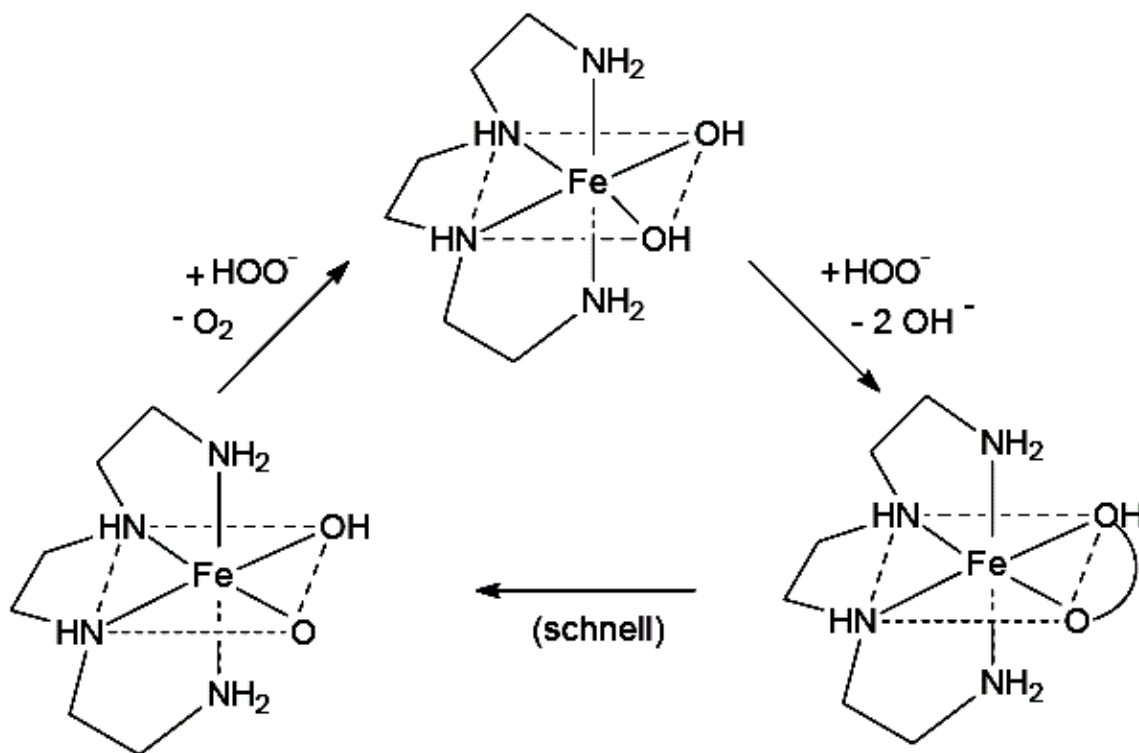
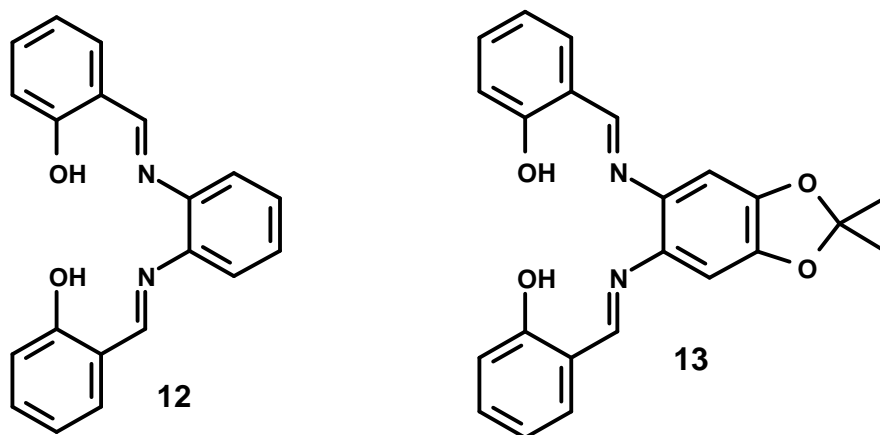


Abb. 9: Reaktion von Fe(III)- Triethylentetraamin mit H_2O_2 bei pH 10^[37]

Der Eisen(III)-Komplex von Tris-2-aminoethylamin **10** soll ähnliche katalytische Eigenschaften aufweisen. Unter biologischen pH-Bedingungen kommt es allerdings zur Zersetzung des Liganden und Fe^{3+} wird hydratisiert, so dass auch hier nicht von einem Katalasemimetikum geredet werden kann.

Außerdem wurden von mir in der Diplomarbeit^[34] die Eisen(III)- Komplexe der N,N'-Bis(salicyliden)-o-phenylendiamine (Salophen) **12** und **13** hinsichtlich ihrer katalasemimetischen Aktivität untersucht.



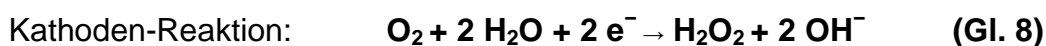
Sie zeigten jedoch unter physiologischen Bedingungen weder katalase- noch peroxidasemimetische Eigenschaften.^[34] Jedoch wurden die Mangan(II)-Komplexe ähnlicher Salen (N,N'-Bis(salicyliden)-1,2-ethyldiamin) -Verbindungen von Doctrow *et al.*^[38-40] als Superoxiddismutase- und Katalasemimetika beschrieben.

Daher ist es eines der Ziele dieser Arbeit gewesen, nach anderen möglichen nicht makrozyklischen Eisen(III)-Komplexen mit katalasemimetischen Eigenschaften zu suchen.

1.4.2.4 Nachweis der katalasemimetischen Reaktion

Zum Nachweis der Katalase – Reaktion nach Gl. 7 bietet es sich an, den bei der Reaktion freigesetzten Sauerstoff zu detektieren. Dies kann beispielsweise volumetrisch geschehen. Da der Messbereich jedoch mit Konzentrationen im mikromolaren Bereich sehr gering ist, bietet sich hierfür die polarographische Messung an. Hierzu wird mittels einer Clark-Elektrode detektiert.^[29, 41]

Diese gassensitive Elektrode besteht aus einer Platin-Kathode und einer ringförmig angeordneten Silber-Anode. Als Elektrolyt dient eine Kaliumchlorid-Lösung, die für den elektrischen Kontakt sorgt. Die Elektrode wird von einer Teflonmembran umschlossen und mit einer konstanten Gleichspannung von 1.5 V polarisiert. Der durch die Membran diffundierende Sauerstoff wird an der Kathodenoberfläche entsprechend einem Vier-Elektronen-Mechanismus reduziert.



Ein mit 1.5 M Kaliumchlorid-Lösung getränktes Papier unter der Teflonmembran dient als Elektrolytbrücke und gewährleistet einen geschlossenen Stromkreis. An der Anode wird das Silber oxidiert und Silberchlorid abgeschieden.



Die dadurch erzeugte Spannungsdifferenz steht im direkten stöchiometrischen Verhältnis zur Sauerstoff-Reduktion und wird als Spannungsänderung (ΔU in Abb. 10) gemessen.

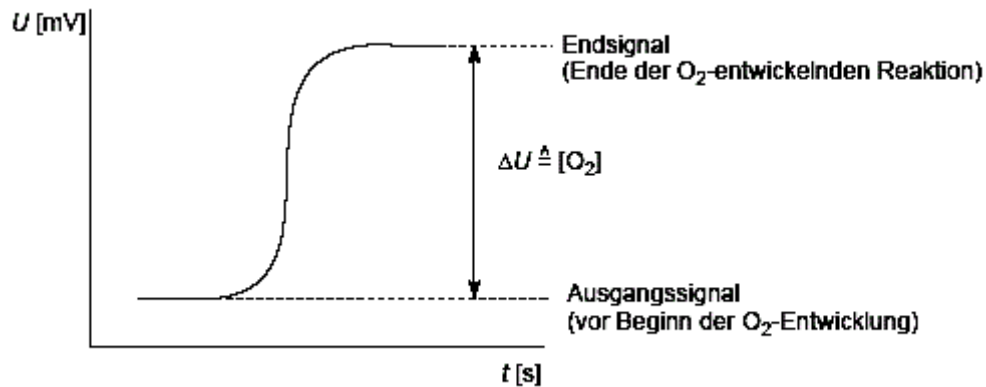


Abb. 10: Detektierbare Zeit-Spannungskurve einer O_2 -Clark-Elektrode^[29]

Durch Kalibrierung der Elektrode durch Freisetzung bekannter Sauerstoffmengen mittels eines Systems aus Katalase und einer bekannten Menge Wasserstoffperoxid kann so die durch ein Mimetikum freigesetzte Sauerstoffmenge bestimmt werden.

1.4.3 Betrachtung der Mimetika als Enzyme ohne Protein

Da es sich bei den Katalasemimetika um Eisen(III)-komplexe ohne Proteinhülle handelt und die prosthetische Gruppe von Peroxidase und Katalase mit Ausnahme der 5. Koordinationsstelle, die bei der Katalase durch einen Tyrosin-Rest und bei der Peroxidase durch einen Histidin-Rest besetzt wird, identisch sind, besteht die Möglichkeit, dass sowohl Katalase- als auch Peroxidasereaktionen katalysiert werden können. An Hand der freien Häm-Komplexe wurde dies bereits von Wang *et al.*^[42] untersucht. In den Arbeiten von Jörg Baute^[30] und Martin Lange^[43] wurden hierzu auch bereits erste Untersuchungen zur Peroxidase-Aktivität der Eisen(III)-tetraaza[14]-annulen-Komplexe vorgenommen, die in dieser Arbeit vertieft werden sollen. Der für die beiden Reaktionswege verantwortliche Mechanismus ist in Abb. 11 dargestellt. Zunächst wird hierbei aus dem Eisen(III)-Grundzustand durch ein Molekül Wasserstoffperoxid zum Compound I', der sogenannten Ferryl-Species oxidiert. Dieser Compound I' kann nun alternativ mit einem weiteren Molekül Wasserstoffperoxid unter Bildung von Sauerstoff und Wasser zum Ausgangszustand

zurückreagieren (katalasemimetischer Weg Abb. 11 oben) oder mit einem Wasserstoffdonor **SH** unter Bildung eines Radikals **S[•]** zu Compound II' reagieren. Compound II' kann im Anschluss mit einem weiteren Wasserstoffdonor **SH** unter Radikalbildung (**S[•]**) und Wasserabspaltung ebenfalls zum Ausgangszustand zurückreagieren (peroxidasemimetischer Weg Abb. 11 unten). Die hierbei gebildeten Radikale können anschließend dimerisieren, disproportionieren oder andere Radikalreaktionen starten.

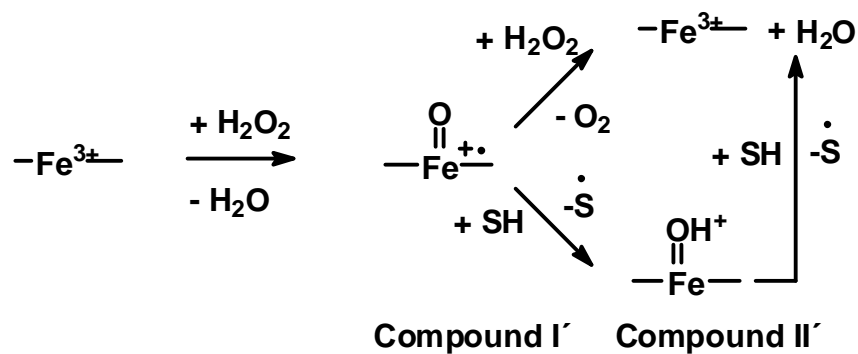
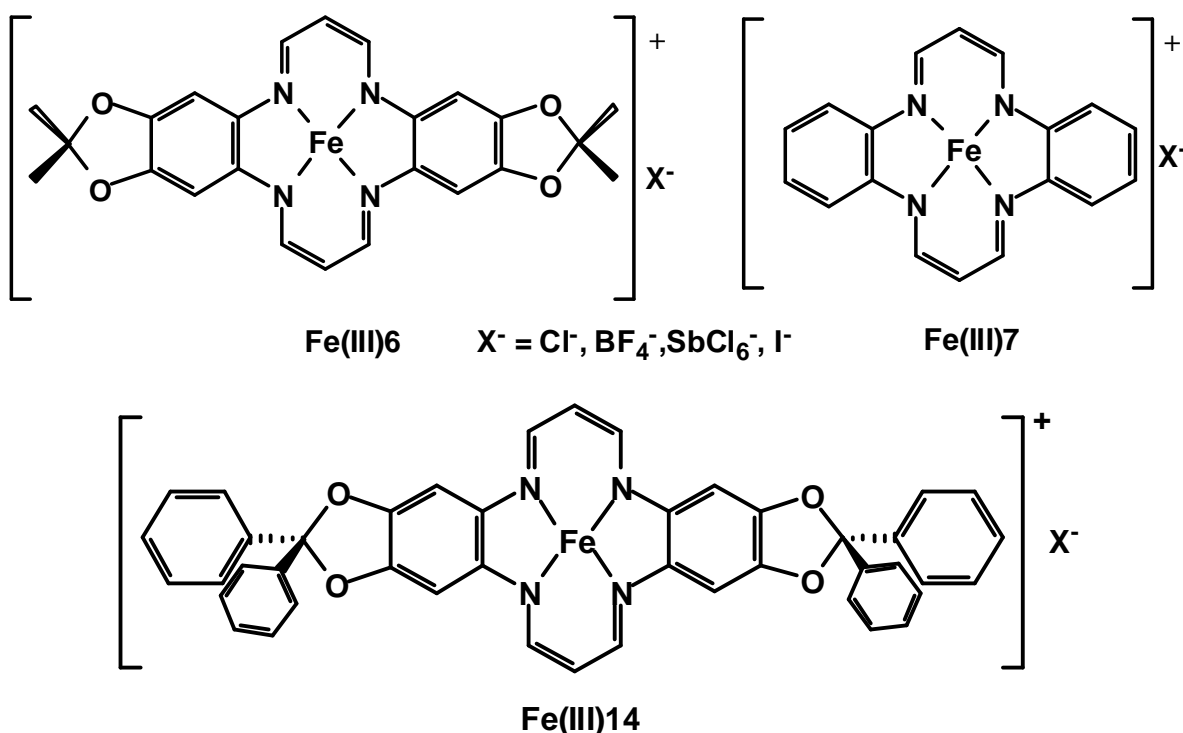


Abb. 11: Mechanismen der Katalase und Peroxidase über die Ferryl-Species

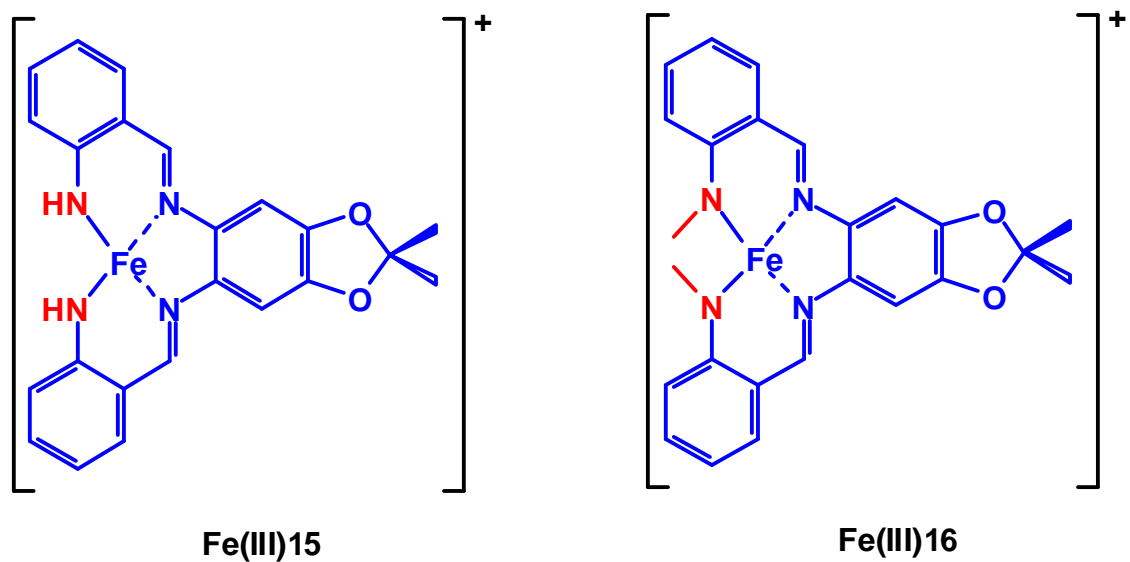
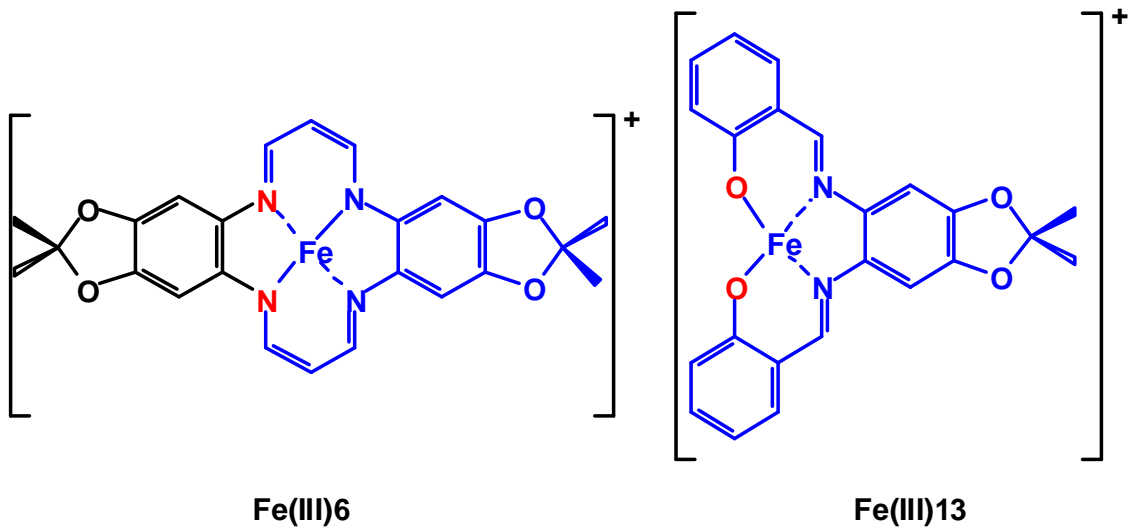
Es zeigt sich hierbei, dass für beide Reaktionswege Compound I' durchlaufen wird. Ist dies der Fall und liegt kein Protein oder eine andere Hinderung vor, so stellen nach Bildung von Compound I' der peroxidasemimetische und der katalasemimetische Weg Konkurrenzreaktionen zueinander dar. Daher sollten Katalasemimetika mit geeigneten Peroxidasesubstraten auch Peroxidasereaktionen eingehen können. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit an den in unserem Arbeitskreis synthetisierten Katalasemimetika überprüft.

2 Problemstellung

In dieser Arbeit geht es darum zu überprüfen, ob die in unserem Arbeitskreis bereits erfolgreich getesteten Katalasemimetika auf Tetraaza[14]annulen-Basis (**Fe(III)6**, **Fe(III)7**, **Fe(III)14**) neben der katalasemimetischen Eigenschaft auch zusätzlich noch Eigenschaften der Häm-Peroxidasen aufweisen. Es soll wahrscheinlich gemacht werden, dass eine compound-I-artige Zwischenstufe durchlaufen wird und die unterschiedlichen Reaktionen der nativen Enzyme nur auf der Struktur des Proteins beruhen.



Weiterhin wird untersucht, ob es möglich ist, nicht makrozyklische Eisen(III)-Komplexe zu synthetisieren, die katalase- bzw. peroxidasemimetische Eigenschaften aufweisen. Hierbei sollen zunächst die OH-Gruppen in den Salophen-Liganden **12** und **13** durch Amino-Gruppen ersetzt werden, um die Komplexe **Fe(III)15** bzw. **Fe(III)16** herzustellen. Dies sollte eine Anpassung an das Ligandenfeld im Tetraaza[14]annulen-Komplex **Fe(III)6** hervorrufen und somit zu einer Verbesserung der enzymmimetischen Eigenschaften führen.

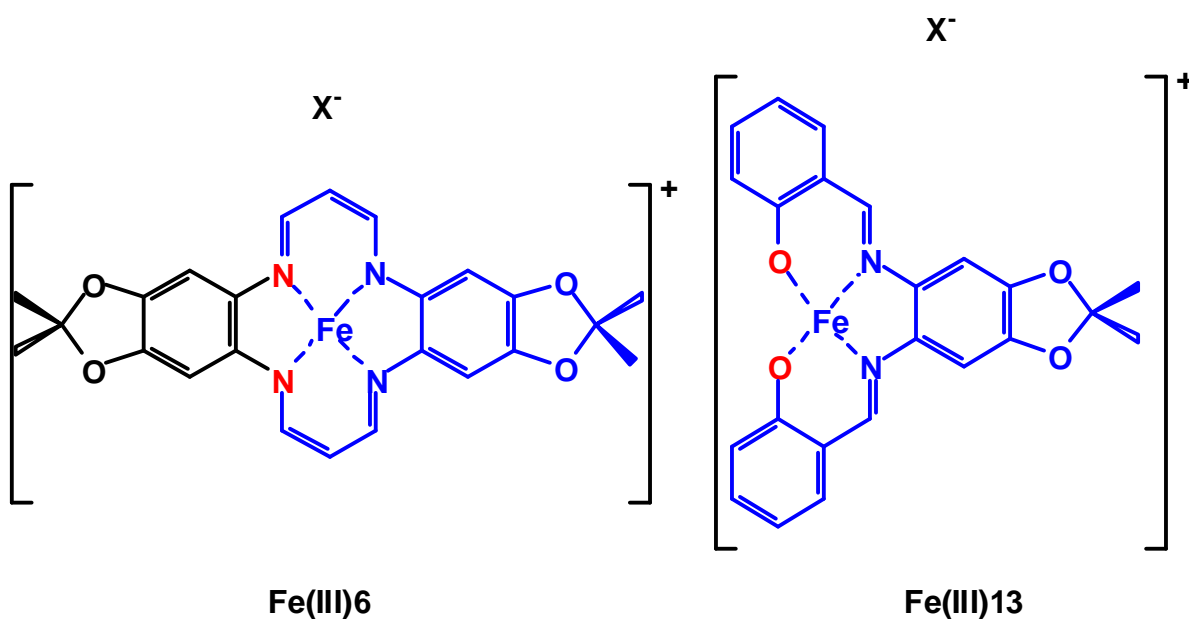


Zusätzlich soll die Hypothese überprüft werden, ob die protektive Wirkung des Liganden **6** im zellulären System, die höher ist als die protektive Wirkung des Komplexes **Fe(III)6Cl**^[33], auf einer intrazellulären Komplexbildung von freiem Eisen beruht. Hierdurch würde die Fenton-Reaktion vermindert und Wasserstoffperoxid über das gebildete Katalasemimetikum zu Sauerstoff und Wasser abgebaut.

3 Praktische Durchführung

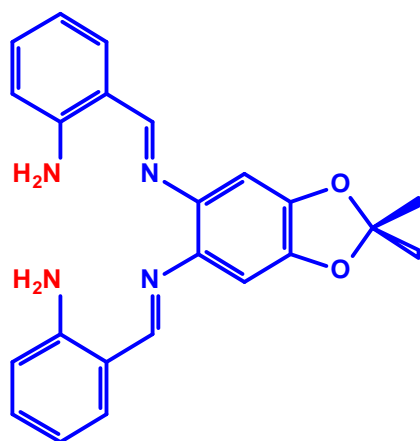
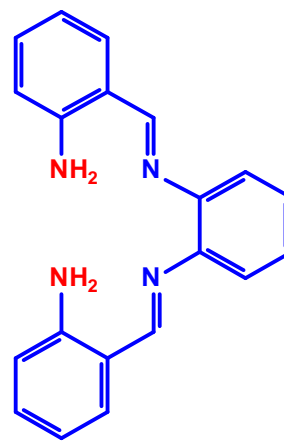
Wie bereits in der Problemstellung erwähnt, sollten zum einen die in unserem Arbeitskreis synthetisierten, katalasemimetischen Eisen(III)-Tetraaza[14]annulen-Komplexe **Fe(III)6**^[32], **Fe(III)7**^[30, 44] und **Fe(III)14**^[30, 43, 45] hinsichtlich ihrer peroxidase-mimetischen Fähigkeit untersucht werden. Zum Anderen sollten Komplexe von nicht zyklischen Liganden mit vier Stickstoffatomen, basierend auf den Salophen-Liganden **12** bzw. **13**, dargestellt werden, indem die beiden Sauerstoffatome gegen Amino-Gruppen ausgetauscht werden, um so eine Annäherung an das TAA-Ligandenfeld zu erzielen und somit weitere mögliche Enzymmimetika zu synthetisieren.

Zunächst möchte ich das Augenmerk auf die Synthese der offenkettigen Liganden richten.

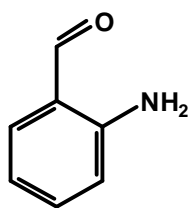


3.1 Darstellung der offenkettigen Liganden

Es sollte die Synthese der dem Salophen **12** bzw. **13** analogen N,N'-Bis-(2-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamin (Abphen) Liganden **15** bzw. **17** durchgeführt werden.

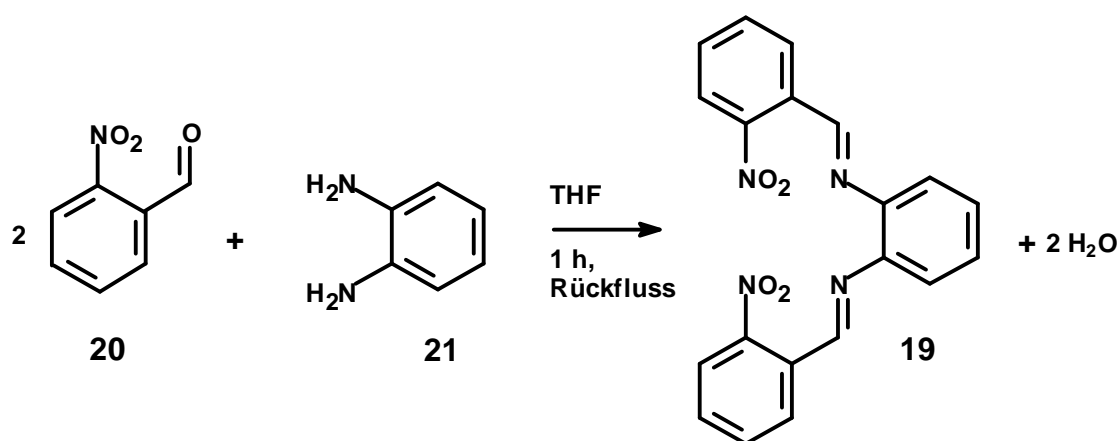
**15****17**

Die Verbindung **17** wurde bereits 1937 von Pfeiffer *et al.*^[46] hergestellt, ist aber weder isoliert noch vollständig charakterisiert worden. Außerdem stellte sich das Problem, dass der 2-Aminobenzaldehyd **18**, der für die Reaktion benötigt wird, aufgrund seiner Kondensation mit sich selbst thermisch nur sehr gering stabil ist.

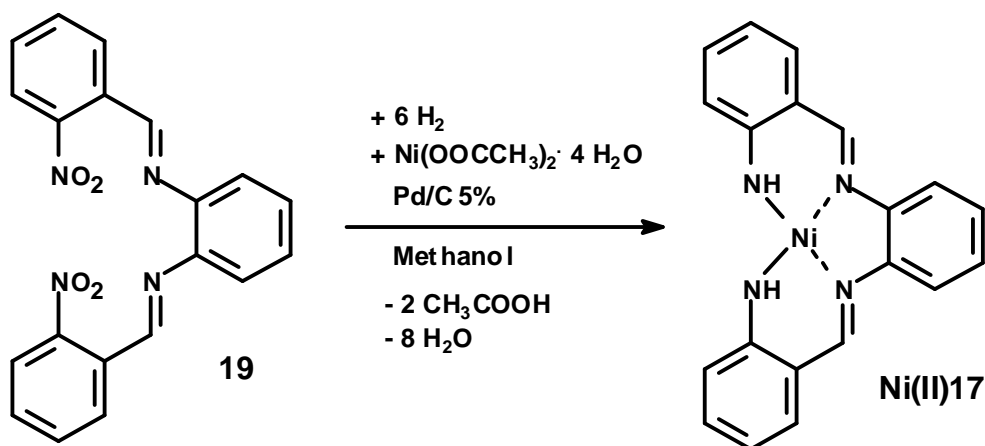
**18**

3.1.1 Templat-Synthesen der Liganden

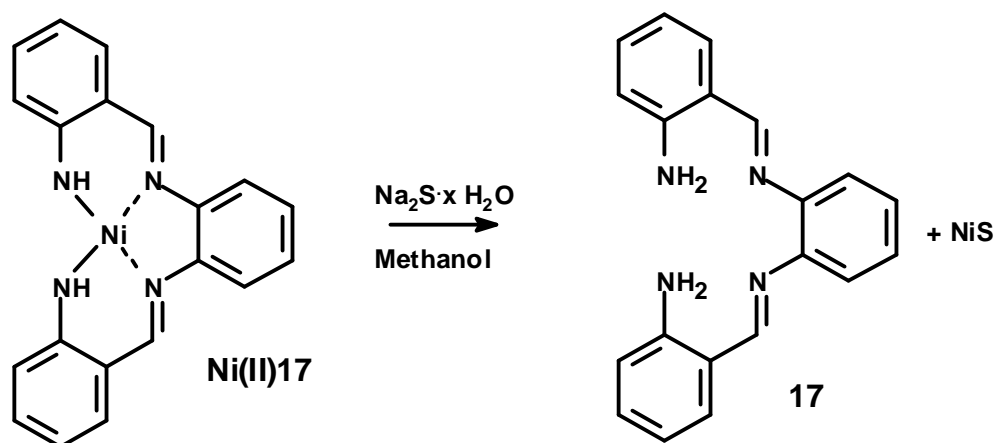
Zunächst wurde auf das bereits in der Diplomarbeit^[34] hergestellte 2-Nitroderivat **19** zurückgegriffen. Dieses wurde aus 2-Nitrobenzaldehyd **20** hergestellt, der unter Schutzgas in trockenem THF gelöst vorgelegt und mit der entsprechenden Menge 1,2-Phenylendiamin **21** versetzt wurde. Das Gemisch wurde eine Stunde unter Rückfluss gekocht, weitgehend eingeeengt, in wenig Chloroform aufgenommen und aus Ethanol auskristallisiert. Der so erhaltene orange Feststoff wurde abgesaugt, mit kaltem Ethanol gewaschen und aus Cyclohexan umkristallisiert. Nachdem Reste an 2-Nitrobenzaldehyd **20** durch Sublimation im Ölpumpenvakuum entfernt wurden, betrug die Ausbeute 80 %. Die Charakterisierung erfolgte anhand von NMR- und ESI-Spektren.



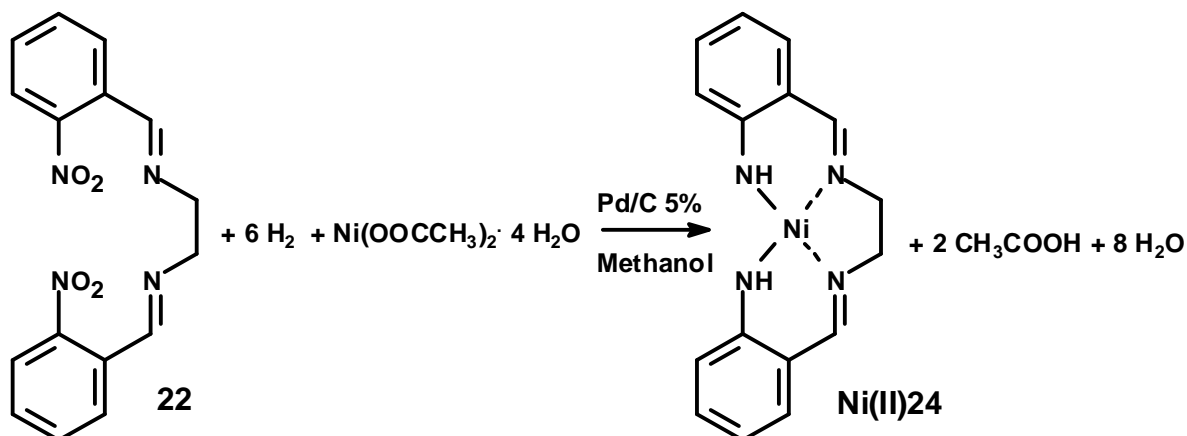
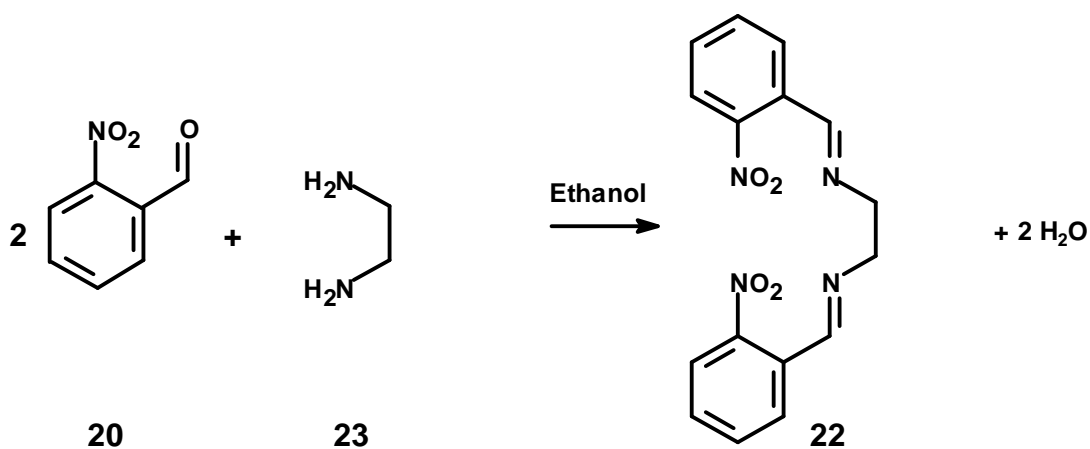
Um eine Reduktion der Imino-Gruppen zu verhindern, wurde analog der Synthese von Green *et al.*^[47] die Reduktion der Nitrogruppen unter gleichzeitiger Bildung des Nickel(II)-Komplexes **Ni(II)17** durchgeführt. Hierzu wurde eine Hydrierung in Methanol bei Raumtemperatur und unter Normaldruck mit 5% Palladium auf Aktivkohle als Katalysator in einer Hydrierungsapparatur über Nacht durchgeführt. Als Nickel(II)-Salz wurde Nickel(II)-acetat verwendet. Der Katalysator wurde unter Schutzgas über Celite 545 abgetrennt und mit heißem DMF nachgewaschen. Das Filtrat wurde bis zur Trockene eingeeengt und aus THF umkristallisiert. Der so erhaltene rote Nickel(II)-Komplex wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet, die Ausbeute betrug 78 %. Die Charakterisierung erfolgte per ESI-Massenspektrometrie und Elementaranalyse.

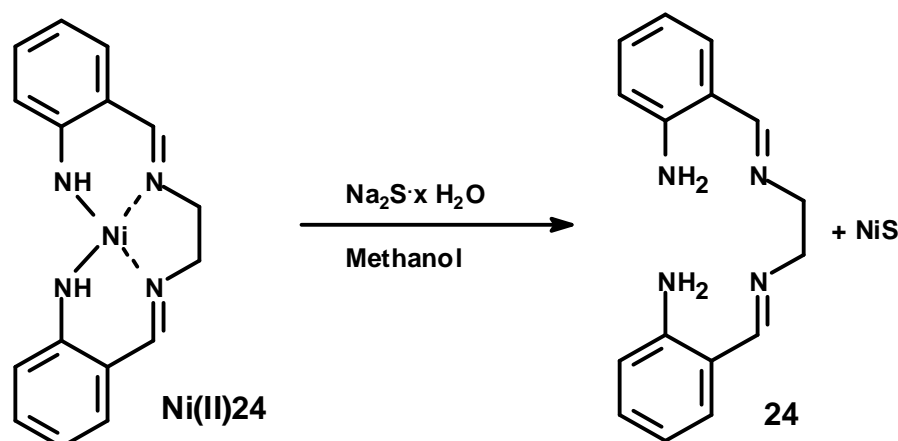


Der Nickel-Komplex **Ni(II)17** sollte durch Entmetallisierung in den freien Liganden **17** überführt werden. Dies sollte durch Ausfällen von Nickel(II)-sulfid geschehen.^[48] Hierzu wurde der Nickel(II)-Komplex **Ni(II)17** in Methanol gelöst und mit 10%iger Natriumsulfid-Lösung versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat mit Chloroform extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingedunstet. Der Filtrückstand wurde mit heißem Ethanol extrahiert und ebenfalls bis zur Trockene eingedunstet. Die so erhaltenen schwarzen Feststoffe enthielten jeweils noch Nickel(II)-komplex und Ligand **17**. Um diese zu trennen wurden die Feststoffe in Chloroform aufgenommen und eine säulenchromatographische Trennung über basischem Aluminiumoxid durchgeführt. Eine Trennung konnte jedoch nicht erreicht werden.



Da nach dieser Methode kein freier Ligand **17** erhalten werden konnte, wurde die Reduktion mit dem entsprechenden literaturbekannten^[47] 2-Nitroen (N,N'-(2'-Nitrobenzyliden)ethylendiamin) **22** durchgeführt. Das 2-Nitroen **22** wurde aus 2-Nitrobenzaldehyd **19** und Ethylendiamin **23** durch Kochen in Ethanol und anschließender Umkristallisation aus Ethanol in einer Ausbeute von 93% hergestellt. Das 2-Nitroen **22** wurde per Hydrierung bei Raumtemperatur und Normaldruck mit Wasserstoff und 5% Palladium auf Aktivkohle als Katalysator zum Nickel(II)-Komplex **Ni(II)24**^[47] und schließlich durch Zugabe von Natriumsulfid zum freien Amben (N,N'-(2'-Aminobenzyliden)ethylendiamin) **24** umgesetzt.

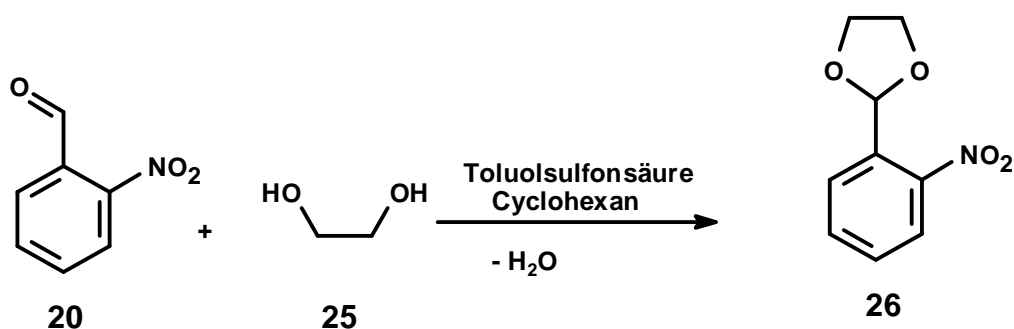




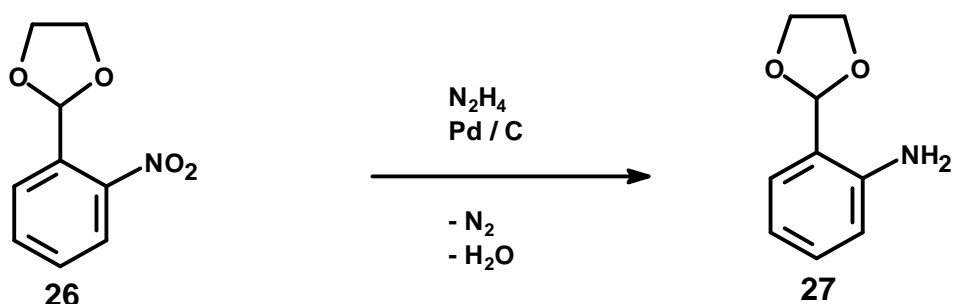
Auch hierbei konnte nur der Nickelkomplex **Ni(II)24** mit einer Ausbeute von 86% isoliert werden, nicht jedoch der freie Ligand **24**. Auch die Sättigung einer ethanolischen **Ni(II)17** bzw. **Ni(II)24** Lösung mit trockenem HCl-Gas führte nicht zum Erfolg, da weder NiCl_2 noch das Hydrochlorid des Liganden ausfielen. Daher wurde im Anschluss ein anderer Syntheseweg mittels Schutzgruppenchemie verfolgt.

3.1.2 Synthese per Schutzgruppenchemie

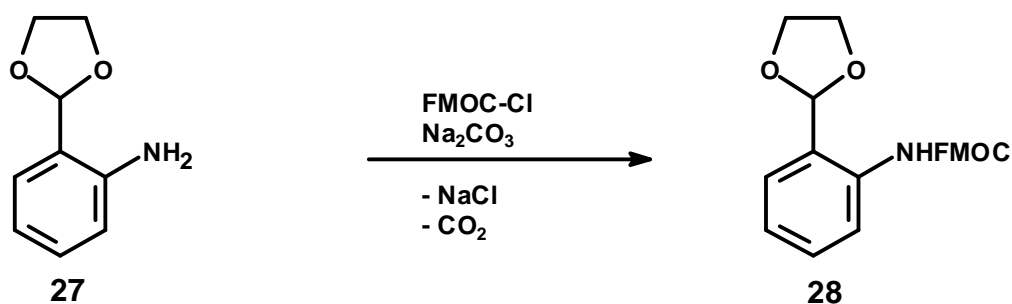
Es wurde vom 2-Nitrobenzaldehyd **20** ausgegangen. Dieser wurde mit 1,2-Ethandiol **25** in Cyclohexan unter Säurekatalyse durch p-Toluolsulfonsäure und Wasserabscheidung über Nacht unter Rückfluss gekocht und als Acetal **26** (2-(2'-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan) geschützt.^[49] Die heiße Cyclohexanlösung wurde von dem entstandenen schwarzen Öl abdekantiert. Beim Abkühlen der Cyclohexanlösung schied sich ein gelbes Öl ab. Dieses Öl wurde mit einer Soda-Lösung extrahiert, um die Säure zu entfernen, und anschließend mit VE-Wasser extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan ausgeschüttelt und die vereinten organischen Phasen eingeeengt. Das so erhaltene Acetal wurde als gelbes Öl **26** in 85%iger Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung erfolgte per NMR- und IR-Spektroskopie sowie ESI-Massenspektrometrie.



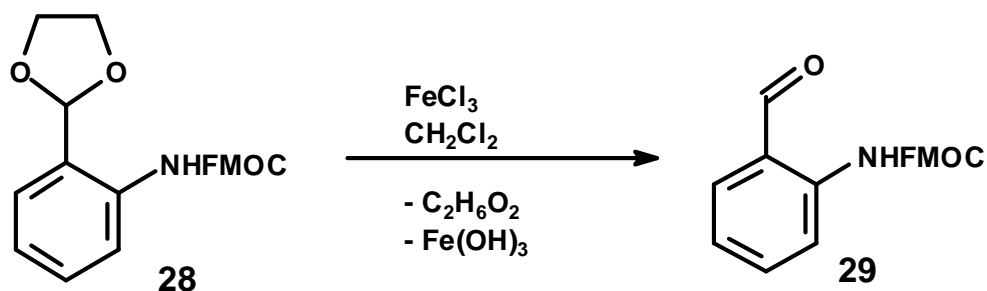
Nun konnte unter Schutzgas die Nitro-Gruppe des Acetals **26** in siedendem Ethanol mit Hydrazin und 10 % Palladium auf Aktivkohle zur Amino-Gruppe reduziert werden, ohne ein Hydrazon zu erzeugen.^[50] Nach beendeter Wasserstoffentwicklung wurde der Katalysator unter Schutzgas über Celite 545 entfernt, das Filtrat eingeeengt und das Produkt **27** mittels Vakuumdestillation gereinigt.



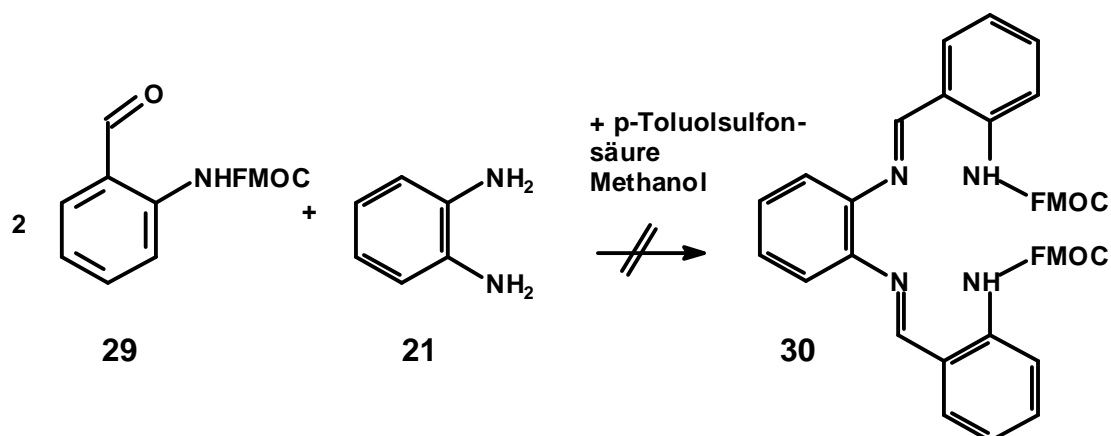
Das in 87% Ausbeute erhaltene 2-(2'-Aminophenyl)-1,3-dioxolan **27** wurde anschließend auch noch an der Amino-Gruppe mit einer Schutzgruppe versehen. Hierzu wurde die gegen saure Reaktionen resistente Fmoc-Schutzgruppe^[51] verwendet. Dies geschah über eine Amid-Synthese, bei der unter Schutzgas eine Lösung von **27** in trockenem THF unter Eiskühlung zu einer Lösung von 9-Fluorenylmethyl-chlorformiat (**Fmoc-Cl**) in trockenem THF zugetropft wurde. Das Gleichgewicht wurde anschließend durch Zugabe von 10%iger Sodalösung auf die Seite der Produkte verschoben. Zur Isolation des Produktes wurde die wässrige Phase mehrfach mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen eingeeengt. Das Produkt **28** fiel als orange-gelbes Öl in einer Ausbeute von 95% an und wurde per NMR-Spektren charakterisiert.



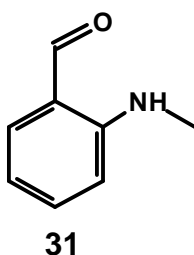
Anschließend wurde die Carbonyl-Funktion von **28** durch säurekatalytierte Hydrolyse mit Eisen(III)-chlorid freigesetzt.^[52] Hierzu wurden (2'-N-FMOC-aminophenyl)-1,3-dioxolan **28** und Eisen(III)-chloridhexahydrat in Dichlormethan 20 Minuten lang unter Rückfluss gekocht. Die heiße Reaktionsmischung wurde auf eine kalt gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung geschüttet und das Eisen(III)-carbonat abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Ether extrahiert und das Lösungsmittel abdestilliert. Das erhaltene gelbe Öl **29** wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.



Der mit der FMOC-Gruppe geschützte 2-Aminobenzaldehyd **29** sollte mit den entsprechenden Diamin **21** in Methanol unter Säurekatalyse mit Toluolsulfonsäure zu dem entsprechenden Liganden **30** umgesetzt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die FMOC-Gruppe sterisch für eine Kondensation zu den Liganden zu anspruchsvoll ist und somit die Darstellung fehlschlug.

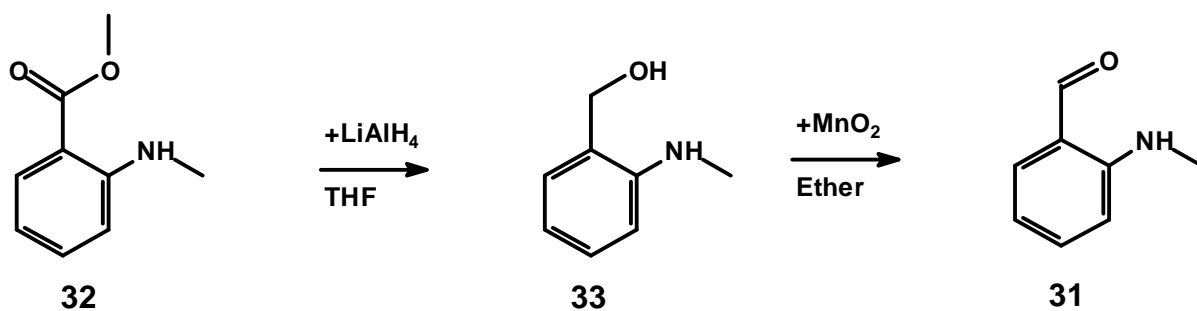


Aus den oben genannten Gründen wurden im nächsten Schritt anstelle der sperrigen Fmoc-Gruppen lediglich Methylgruppen verwendet, um einer Polykondensation des 2-Aminobenzaldehyds **18** vorzubeugen. Hierzu musste zunächst der 2-(Methylamino)-benzaldehyd **31** synthetisiert werden.

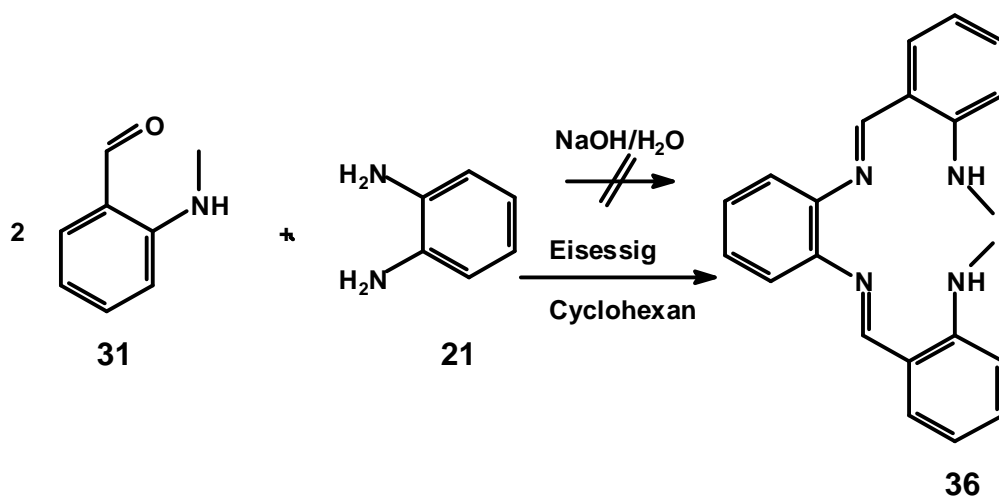
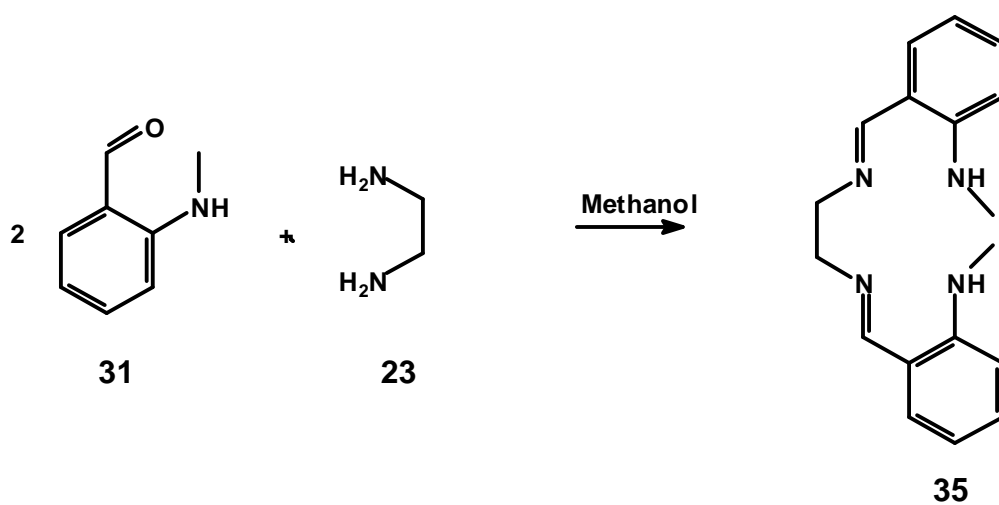


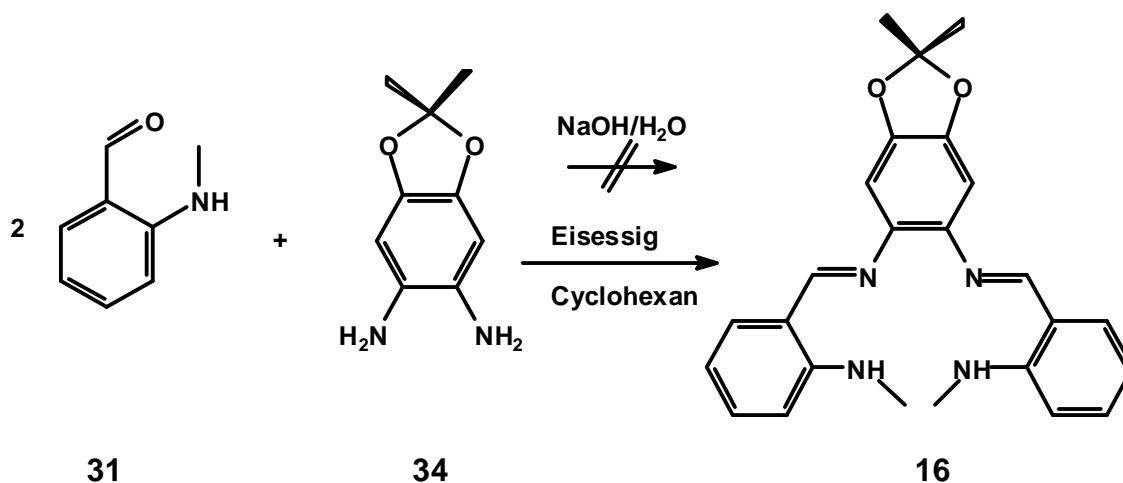
3.1.3 Synthese der Methylamino-Liganden

Unter Schutzgas wurde der N-Methylantranilsäuremethylester **32** mit Lithiumaluminiumhydrid in trockenem THF zum 2-(Methylamino)-benzylalkohol **33** reduziert.^[47] Die Reinigung erfolgte per Vakuumdestillation mit einer Ausbeute von 77%. Der 2-(Methylamino)-benzylalkohol **33** wurde anschließend mit Mangan(IV)-oxid Typ A^[53], das durch Thermolyse bei 220°C aus Mangan(II)-carbonat hergestellt wurde, in Ether zum gewünschten 2-(Methylamino)benzaldehyd **31** oxidiert. Die Ausbeute betrug 63 %.^[47] Die Charakterisierung erfolgte über NMR- und IR-Spektren.



Dieser Aldehyd **31** wurde anschließend mit den Diaminen **23**, **21** oder **34** zum jeweiligen Diimin **35**, **36** bzw. **16** kondensiert.





Die Durchführung der Liganden-Synthesen erfolgte nach in der Literatur^[46, 47] beschriebenen Methoden. Für die aromatischen Diamine **21** und **34** wurden sowohl säurekatalysierte^[54] als auch basenkatalysierte Kondensationen^[46, 47] ausprobiert, da eine unkatalysierte Reaktion nicht stattfand. Bei der von Pfeiffer *et al.*^[46] beschriebenen basenkatalysierten Kondensation in wässriger Natronlauge konnte ein gelbes Öl isoliert werden. Bei der säurekatalysierten Reaktion mit Essigsäure^[54] als Katalysator wurde ein orange-brauner Feststoff erhalten. Von beiden Substanzen wurden ESI-Massenspektren angefertigt. Es zeigte sich, dass das entsprechende Produkt **36** bzw. **16** im Reaktionsprodukt der säurekatalysierten Reaktion nachgewiesen werden konnte, es jedoch noch mit diversen Nebenprodukten verunreinigt war. Die basenkatalysierte Reaktion führte nicht zu dem gewünschten Produkt. Daher wurden mit dem Reaktionsprodukt der säurekatalysierten Reaktion diverse Lösungsmittelgemische und stationäre Phasen ausgetestet, um eine chromatographische Trennung der Substanzen zu erzielen. Ethanol und Ethylacetat auf RP18 zeigten bei der Dünnschichtchromatographie recht vielversprechende Erfolge, da hierbei eine Auftrennung in insgesamt vier Substanzen auftrat. Daher wurde zunächst eine säulenchromatographische Trennung mit reinem Ethanol bzw. reinem Ethylacetat über RP18 als stationäre Phase versucht. Hierbei wurden Fraktionen von ca. 1-2 mL gesammelt und mittels Dünnschichtchromatographie auf ihre Reinheit hin überprüft. Es zeigte sich jedoch, dass hierdurch nur eines der Nebenprodukte teilweise abgetrennt werden konnte. Auch die Trennversuche über MPLC mit Florisil als stationäre und einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch von 7/1 v/v als mobile Phase zeigte, entgegen der durch HPLC-Vorproben getroffenen Prognosen, kein zufriedenstellendes Ergebnis, da hierbei wiederum nur

Produktgemische erhalten wurden. Letztendlich wurde zunächst über eine Kieselgel-Säule mit Dichlormethan eine Vorreinigung durchgeführt, um Verunreinigungen durch noch vorhandene Edukte weitgehend abzutrennen. Anschließend wurden die per ESI- und Dünnschichtchromatographie ermittelten Produktphasen vereinigt und erneut über eine Kieselgel-Säule mit einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch von 4/1 v/v gereinigt. Auch hierbei wurden die Fraktionen durch ESI-Massenspektren und Dünnschichtchromatographie analysiert, eingeeengt und per NMR auf Reinheit überprüft. Das ^1H -NMR von **36** ist in Abb. 12 dargestellt, es zeigt immer noch leichte Verunreinigungen durch Nebenprodukte. Dennoch wurde das Produkt **36** für eine Komplexierung mit Eisen(II)-chlorid eingesetzt. Die Reinigung des Diimins **16** wurde analog durchgeführt. Es wurde ein aufgereinigtes Produkt erhalten, das jedoch immer noch Verunreinigungen enthielt (Abb. 13 zeigt das ^1H -NMR von **16**). Die Ausbeuten betrugen in beiden Fällen 10 %. Auch dieser Ligand wurde mit Eisen(II)-chlorid komplexiert.

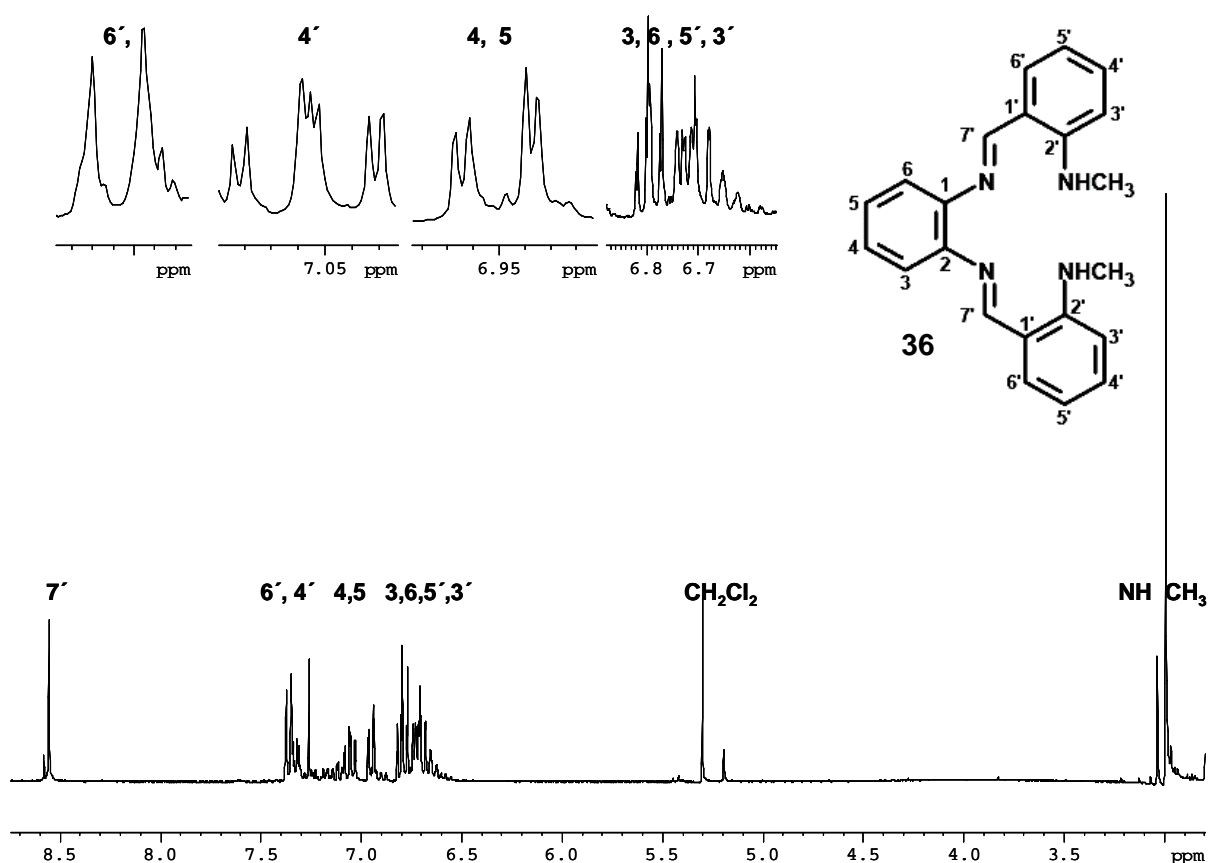


Abb. 12 : ^1H -NMR von **36** in CDCl_3 . Zu erkennen sind noch Verunreinigungen durch Dichlormethanreste und aromatische Nebenprodukte

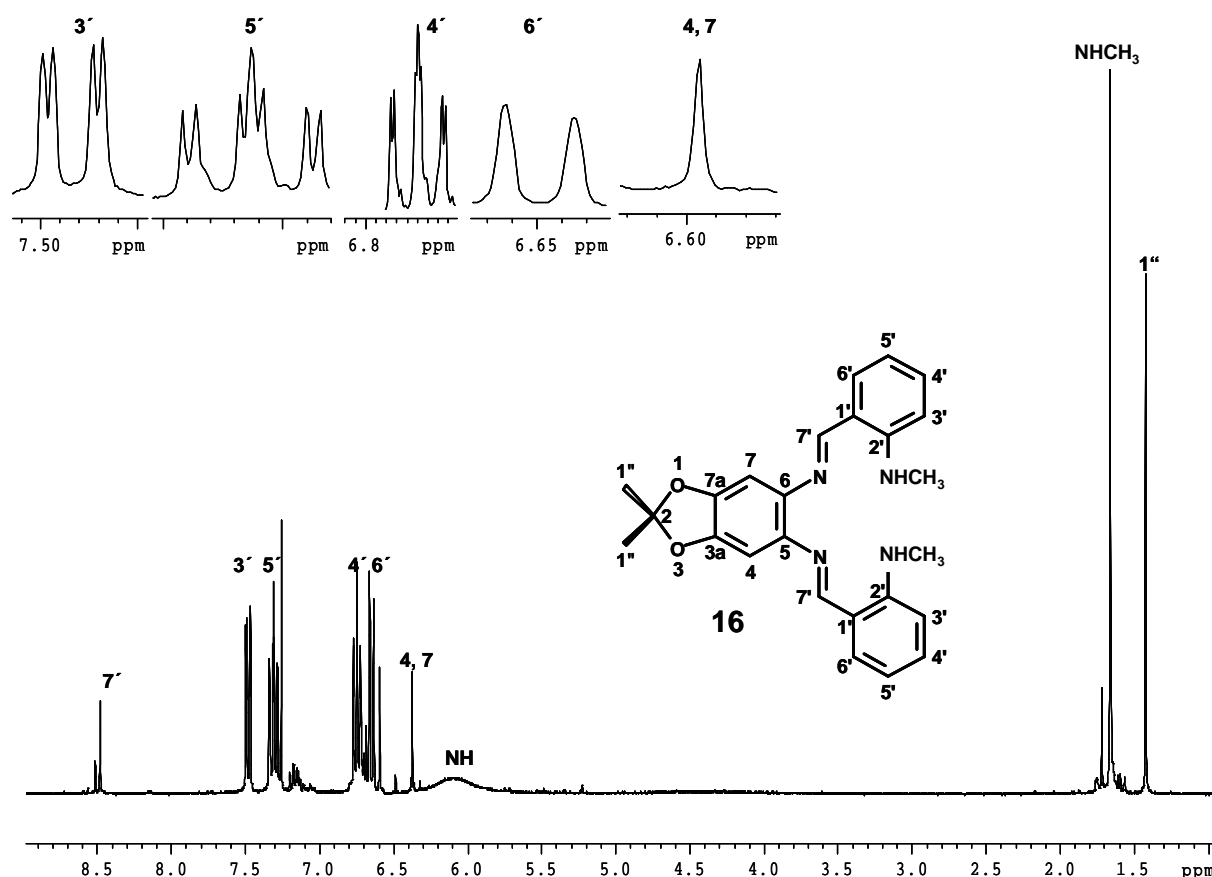


Abb. 13: ^1H -NMR von **16** in CDCl_3 (mit Verunreinigungen im Aromatenbereich durch Nebenprodukte)

Das für die Synthese von **16** verwendete Diamin **34** wurde in einer mehrstufigen Synthese aus Brenzkatechin **37** hergestellt. Dieses wurde zunächst mit Aceton und Phosphor(V)-oxid zum entsprechenden Acetal, dem 2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol **38**, umgesetzt.^[55] Die Reinigung erfolgte per Destillation mit einer Ausbeute von 47%. Das Acetal **38** wurde anschließend einfach nitriert. Hier hatte es sich in früheren Versuchen als sinnvoll erwiesen, nicht die „normale“ Nitriersäure aus Salpetersäure und Schwefelsäure, bzw. Kaliumnitrat und Schwefelsäure zu benutzen, da dies zu einer unerwünschten zweiten Substitution in ortho-Stellung zur OR-Gruppe führt. Stattdessen reichte zur ersten Nitrierung aufgrund der Aktivierung des Ringes durch die OR-Gruppen eine verdünnte 34 %ige Salpetersäure bei 20-30°C aus.^[56]

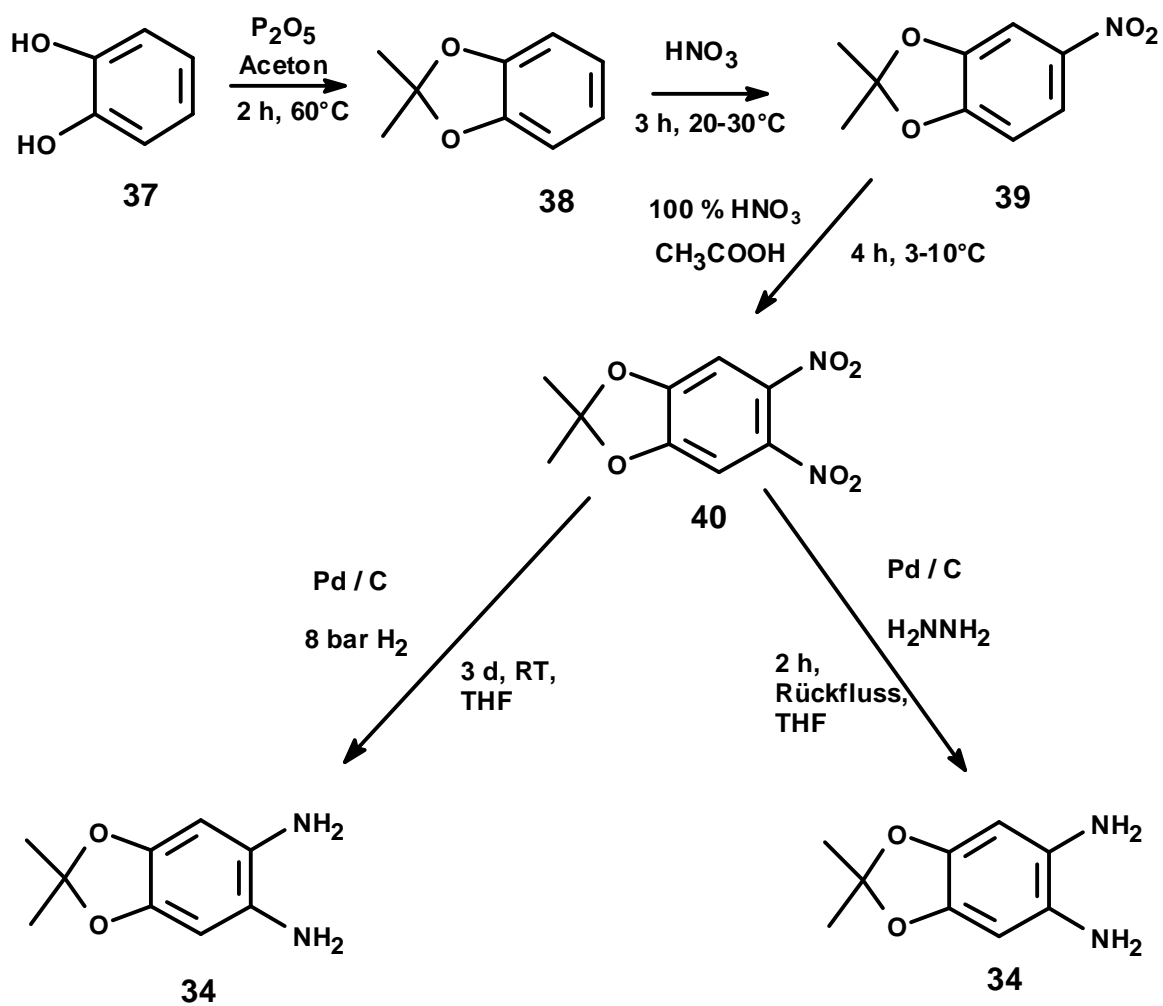
Das so erhaltene 2,2-Dimethyl-5-nitro-1,3-benzdioxol **39** wurde aus Ethanol umkristallisiert, die Ausbeute betrug 97%. **39** konnte dann in einer zweiten Nitrierung zum 2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-1,3-benzdioxol umgesetzt werden. Auch in diesem Fall wurde keine „normale“ Nitriersäure verwendet, da auch hier noch ungewollte Nebenprodukte entstehen würden. Daher wurde für die zweite Nitrierung ein Gemisch aus rauchender 100%iger Salpetersäure und Eisessig eingesetzt. Dadurch wurde eine recht selektive Nitrierung erzielt und das 2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-1,3-benzdioxol **40** nach Umkristallisation aus Ethanol in 69%iger Ausbeute als Hauptprodukt erhalten.^[56]

Die Reduktion von **40** unter Bildung von **34** kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Zwei dieser Möglichkeiten wurden durchgeführt.

In der ersten Variante wurde das 2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-1,3-benzdioxol **40** in trockenem THF gelöst, mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator versetzt und im Laborautoklaven mit elementarem Wasserstoff bei ca. 8 bar mehrere Tage reduziert. Die Ausbeute lag hier bei 94%.^[57]

Die zweite Variante basiert wiederum auf der Reduktion der Nitrogruppen durch die Wasserstofffreisetzung aus Hydrazin und Palladium auf Aktivkohle.^[34, 50] Diese Variante hatte den Vorteil, dass sie nur einige Stunden dauerte und anhand der Stickstoffentwicklung beobachtet werden konnte. Außerdem war die Ausbeute in Variante 2 mit 98 % etwas höher.

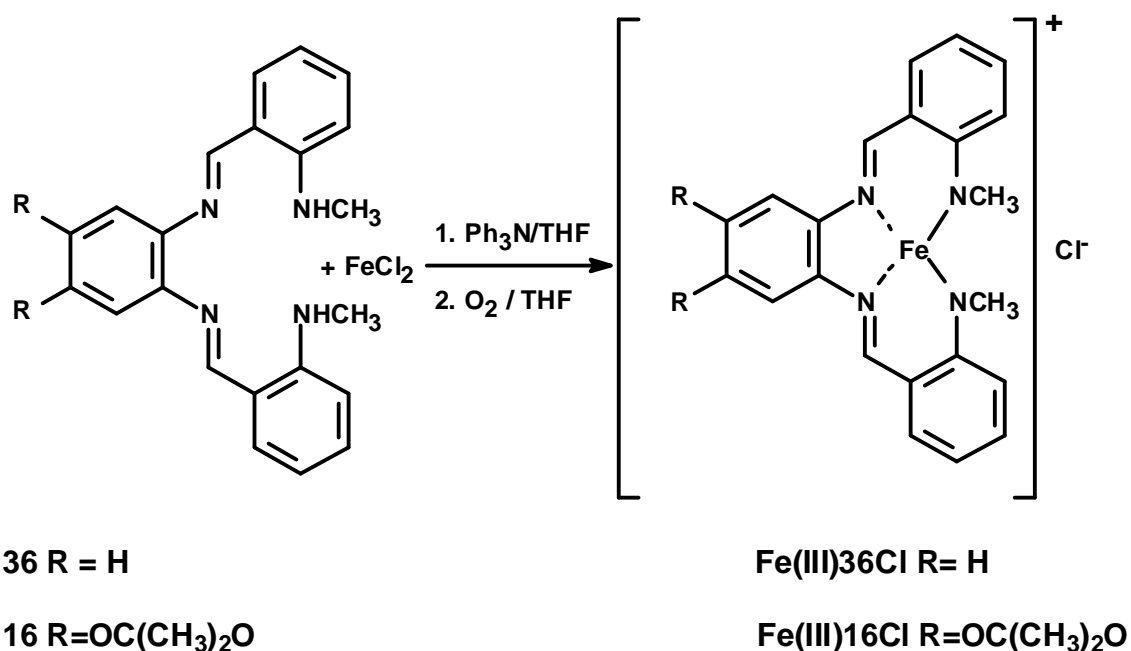
Die Stickstoffentwicklung hatte darüber hinaus noch den Vorteil, dass die luftempfindliche Substanz **34** unter einer immer erneuerten Schutzgasatmosphäre lag, während bei Variante 1 beim Öffnen des Autoklaven Luft an die Probe gelangen konnte.



Das so erhaltene Diamin **34** wurde dann innerhalb von 24 h weiter umgesetzt und zwischenzeitig unter Schutzgas im Gefrierfach gelagert.

3.1.3.1 Komplexierung der Methylaminoliganden

Zur Darstellung der Eisen(III)-Komplexe **Fe(III)16** und **Fe(III)36** wurden zunächst die entsprechenden Eisen(II)-Komplexe **Fe(II)16** und **Fe(II)36** hergestellt, da nach der HSAB-Theorie^[58] (*hard and soft acids and bases* – Theorie der harten und weichen Säuren und Basen) stickstoffhaltige Liganden als Chelatoren für zweiwertiges Eisen gut geeignet sind, während dreiwertiges Eisen besser durch sauerstoffhaltige Liganden komplexiert wird. Hierzu wurde unter Schutzgas eine Lösung von Eisen(II)-chlorid, das unter Argon aufbewahrt und eingewogen wurde, in absolutem THF unter Zusatz von Triphenylamin im molaren Verhältnis $\text{FeCl}_2 / \text{Triphenylamin} = 1/3$ angesetzt und über Nacht gerührt. Diese Lösung wurde dann auf 60°C erwärmt und unter Schutzgas eine Lösung des Liganden **16** bzw. **36** in absolutem THF hinzuge tropft. Hierbei wurde ein molares Verhältnis von ca. 1/1 für $\text{FeCl}_2 / \text{Ligand}$ verwendet. Nach beendeter Zugabe wurde noch einige Zeit bei 60°C nachgerührt.



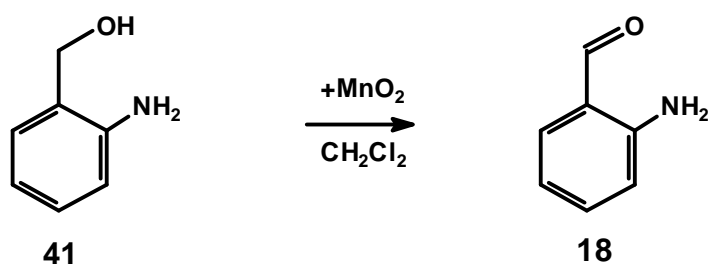
Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurden die Eisen(II)-Komplexe nicht isoliert, sondern die Schutzgasatmosphäre mittels Wasserstrahl-Vakuum abgezogen und durch Öffnen des Hahns Luft in die Apparatur einströmen gelassen. Auf diese Weise wurde die Argon- gegen Luftatmosphäre ausgetaucht und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. So konnte durch Diffusion Sauerstoff in die Reaktionslösung übergehen und hier die vorhandenen Eisen(II)-Komplexe zu den entsprechenden Eisen(III)-Komplexen oxidieren. Als Gegenionen standen in der Lösung noch Chlorid-Ionen zur Verfügung, die die 5. Koordinationsstelle besetzten. Die Lösung wurde auf das halbe Volumen einkondensiert und der Eisen(III)-Komplex durch Zugabe von Hexan ausgefällt. Der ausgefallene Eisen(III)-Komplex wurde unter Schutzgas abfiltriert mit absolutem THF gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Ausbeuten lagen in beiden Fällen bei 20 %. Die so erhaltenen Komplexe wurden per Elementaranalyse (Tab. 2) analysiert. Bei der ESI-Massenspektrometrie zeigte es sich, dass kein Komplexsignal gefunden wurde. Dies lässt vermuten, dass der Komplex nicht ESI-aktiv ist. Die Ausbeute betrug 31 % für **Fe(III)36Cl** und 25 % für **Fe(III)16Cl**. Die so erhaltenen Komplexe wurden hinsichtlich ihrer katalasemimetischen Eigenschaften untersucht (s. Kapitel 4.1).

Tab. 2: Elementaranalyse von **Fe(III)36Cl** THF bzw. **Fe(III)16Cl** THF

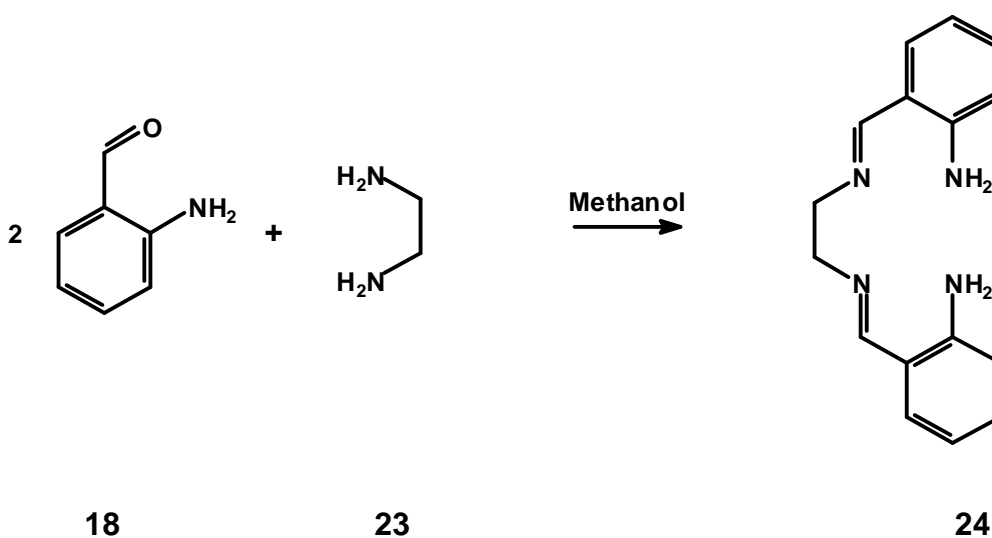
Fe(III)36Cl THF	% Fe	% C	% H	% N
Berechnet	11.08	61.98	5.60	11.12
Gefunden	10.86	62.79	5.40	11.29
Fe(III)16Cl THF	% Fe	% C	% H	% N
Berechnet	9.70	60.48	5.60	9.73
Gefunden	10.08	60.21	5.35	10.10

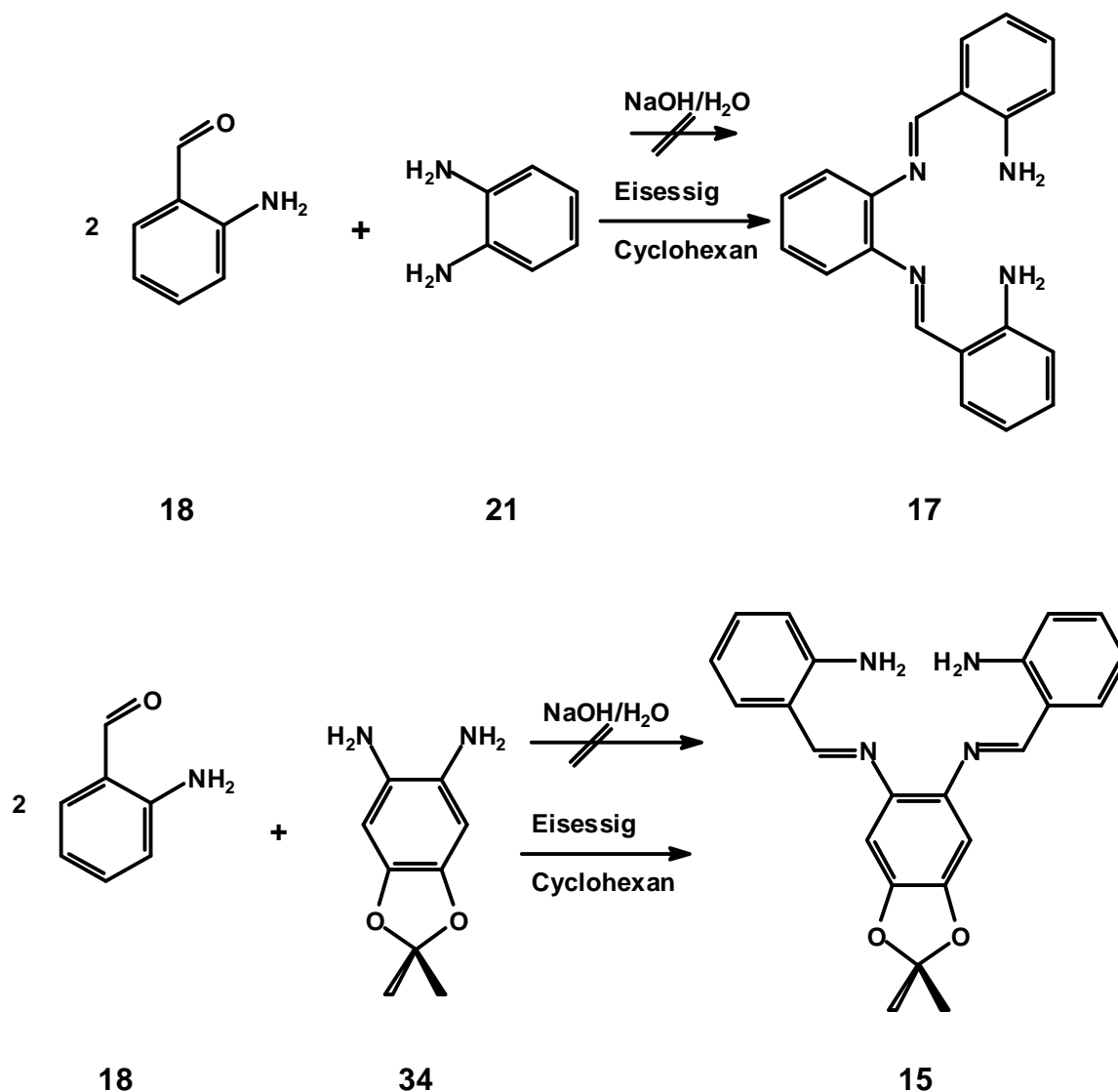
3.1.4 Synthese der Liganden 15, 17, 24 mittels 2-Aminobenzaldehyd

Der 2-Aminobenzaldehyd **18** wurde aus dem käuflichen 2-Aminobenzylalkohol **41** mittels Oxidation mit Mangan(IV)-oxid Typ A^[53] in trockenem Dichlormethan und anschließender säulenchromatographischen Aufreinigung synthetisiert.^[59] Die Ausbeute betrug 48 %.



Dieser Aldehyd wurde unter denselben Bedingungen wie der 2-(Methylamino)-benzaldehyd **31** mit den Diaminen **23**, **21** oder **34** zum jeweiligen Diimin **24**, **17** bzw. **15** umgesetzt.^[46, 47, 60]





Die Synthese des aliphatischen Diimins **24** gelang wiederum ohne größere Probleme, da es bereits ohne Zugabe eines Katalysators in siedendem Methanol innerhalb von 30 Minuten aus den Edukten entstand und beim Abkühlen auskristallisierte. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Methanol. Die Ausbeute lag bei 80 %.

Die Synthesen mit den aromatischen Diaminen **17** bzw. **15** lieferten annähernd dieselben Ergebnisse, wie die Kondensationen mit dem 2-(Methylamino)-benzaldehyd **31**. Die basenkatalysierte Reaktion führte nicht zu dem gewünschten Produkt, während bei der säurekatalysierten Reaktion nur stark mit Nebenprodukten verunreinigte Fraktionen erhalten wurden. Hier wurde wiederum eine säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes durchgeführt. Hierzu wurde das Rohprodukt über eine Kieselgel-Säule mit einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch von 4/1 v/v vorgereinigt und die durch ESI-Massenspektrometrie und

Dünnschichtchromatographie bestimmten Produktfraktionen vereinigt und noch einmal über eine Kieselgel-Säule mit einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch von 4/1 v/v gereinigt. Hierbei wurde eine hinreichende Reinigung von **17** erzielt, so dass eine Komplexierung mit Eisen(II)-chlorid durchgeführt werden konnte. Die Ausbeute an **17** betrug 10 %. Das NMR-Spektrum von **17** (Abb. 14) zeigte noch Verunreinigungen durch Nebenprodukte. In analoger Weise wurde auch das Diiimin **15** säulenchromatographisch gereinigt (Abb. 15 zeigt das ^1H -NMR von **15**), mit 11% Ausbeute erhalten und zur Komplexierung eingesetzt.

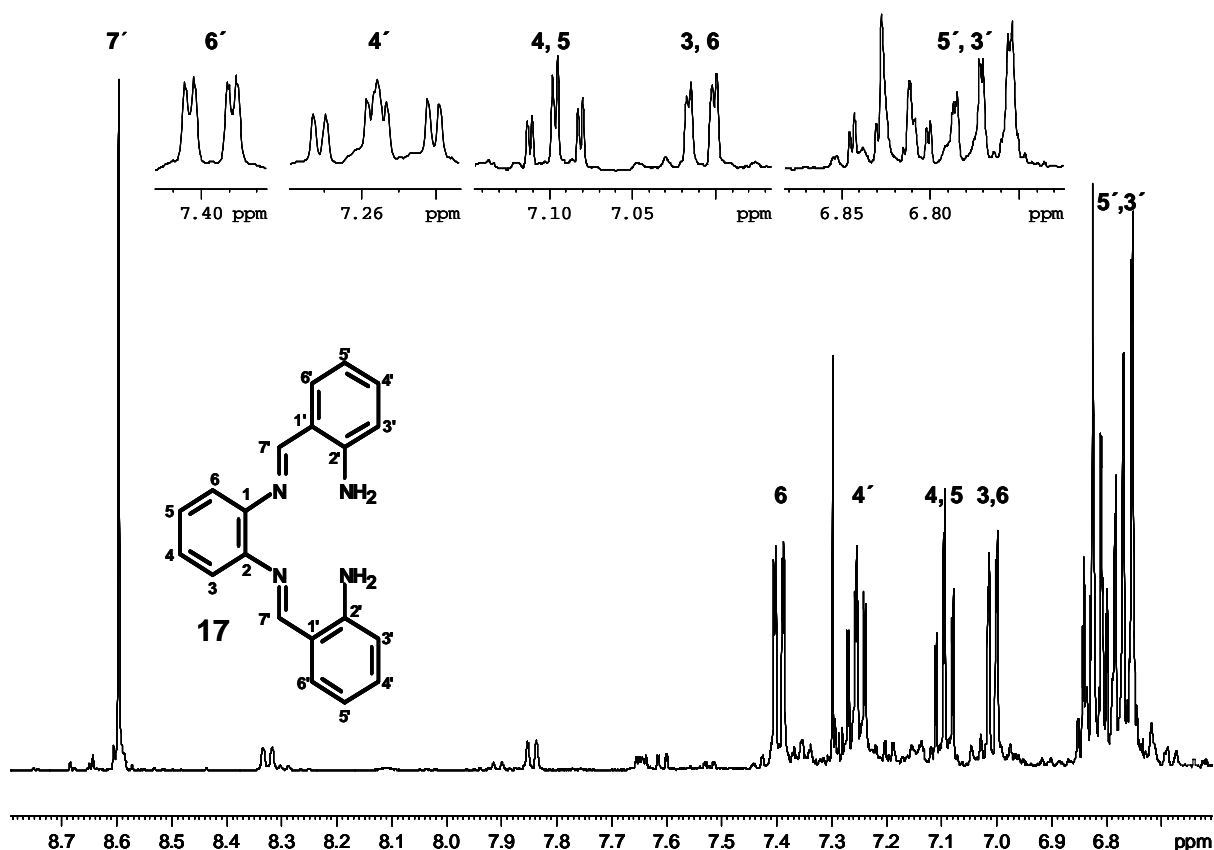
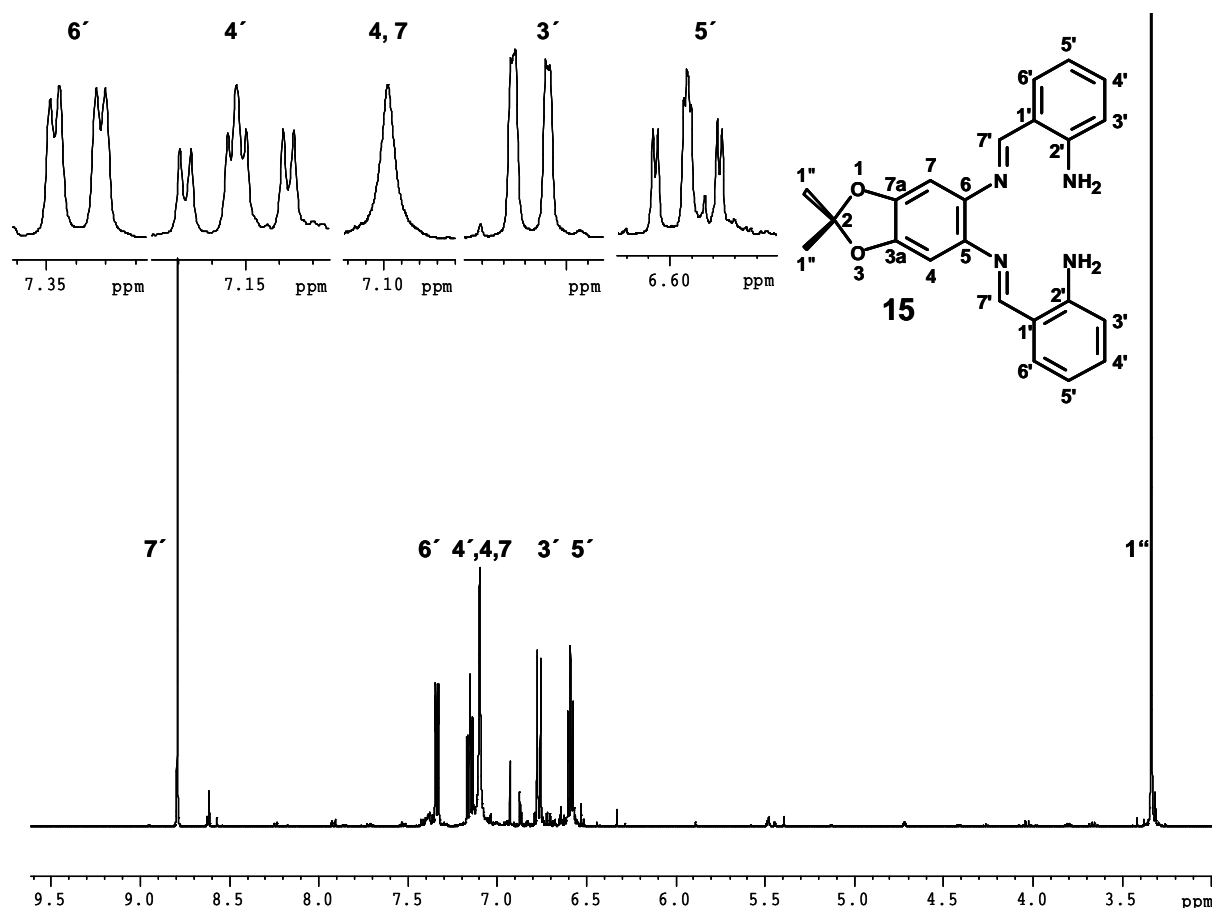
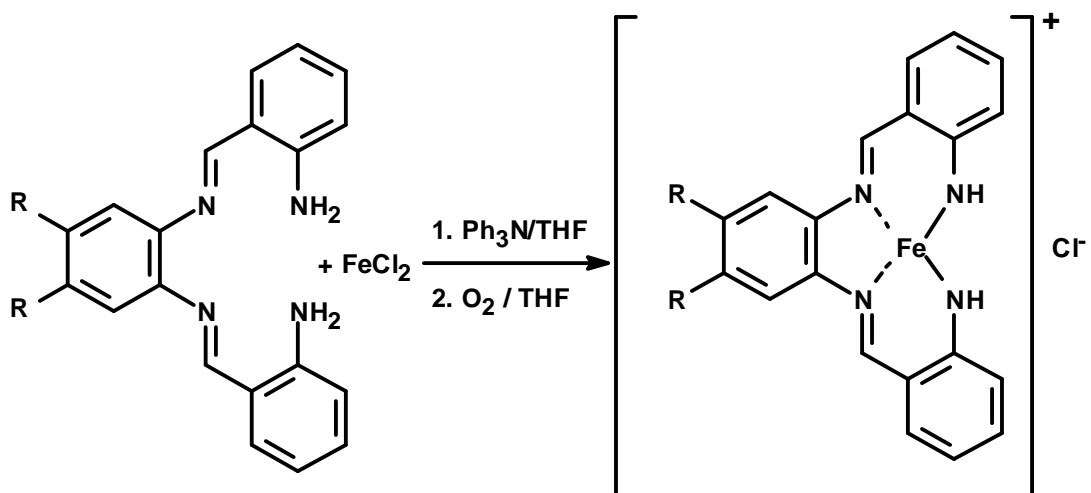


Abb. 14: ^1H -NMR von **17** in CDCl_3 (Verunreinigung durch Nebenprodukte)

Abb. 15: $^1\text{H-NMR}$ von **15** in DMSO-d_6

3.1.4.1 Komplexierung der Aminoliganden

Die Komplexierung der Amino-Liganden **15** bzw. **17** erfolgte analog der unter 3.1.3.1 beschriebenen Methode unter Schutzgas mit Triphenylamin als Base und Eisen(II)-chlorid als Eisensalz. Die Oxidation erfolgte durch Entfernen der Argonatmosphäre über der Lösung. Sie wurde durch Luft ersetzt und durch den Luftsauerstoff die Eisen(II)-Komplexe zu Eisen(III)-Komplexen oxidiert. Die Komplexe wurden per Elementaranalyse (Tab. 3) analysiert. Auch diese Komplexe erwiesen sich als nicht ESI-aktiv. Die Ausbeute betrug 32 % für **Fe(III)17Cl** und 20 % für **Fe(III)15Cl**. Die Komplexe wurden hinsichtlich ihrer katalasemimetischen Eigenschaften untersucht (s. Kapitel 4.1).



17 R = H

Fe(III)17Cl R= H

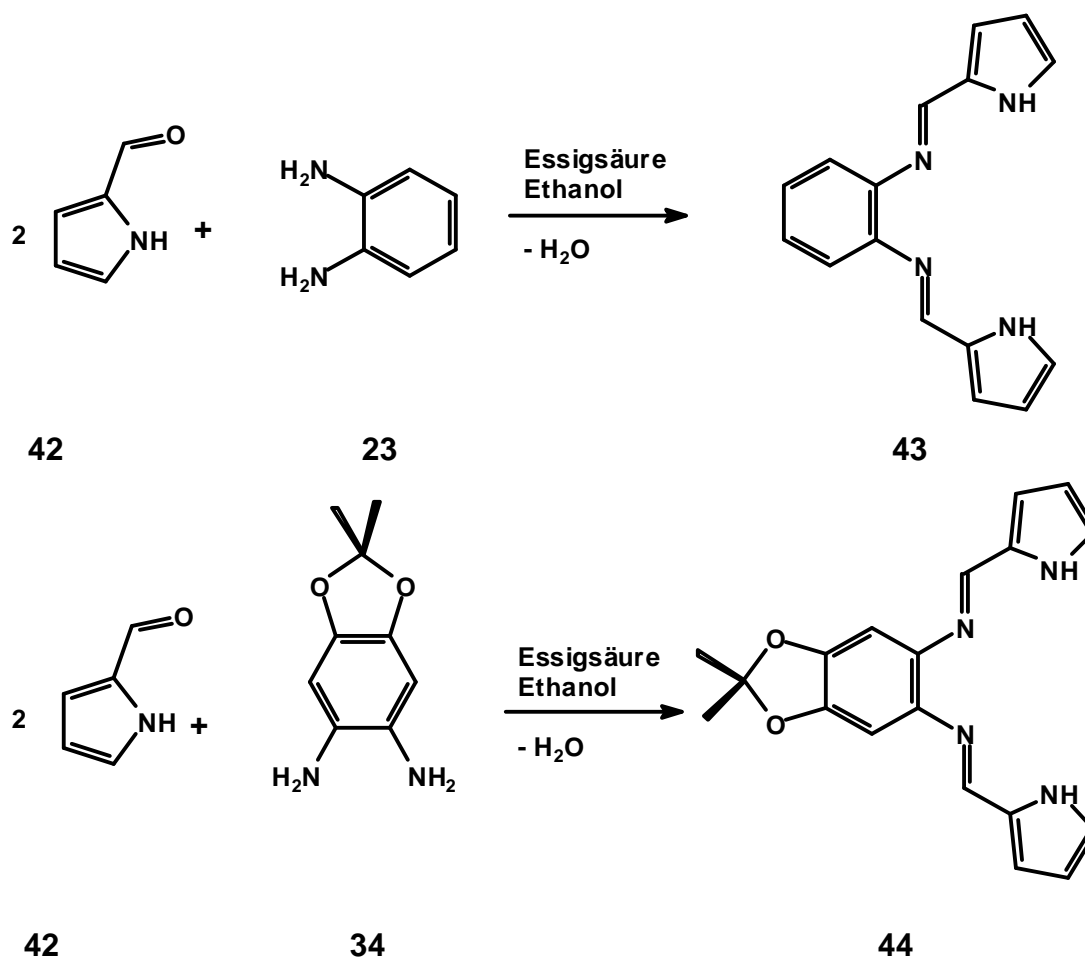
15 R=OC(CH₃)₂OFe(III)15Cl R=OC(CH₃)₂O

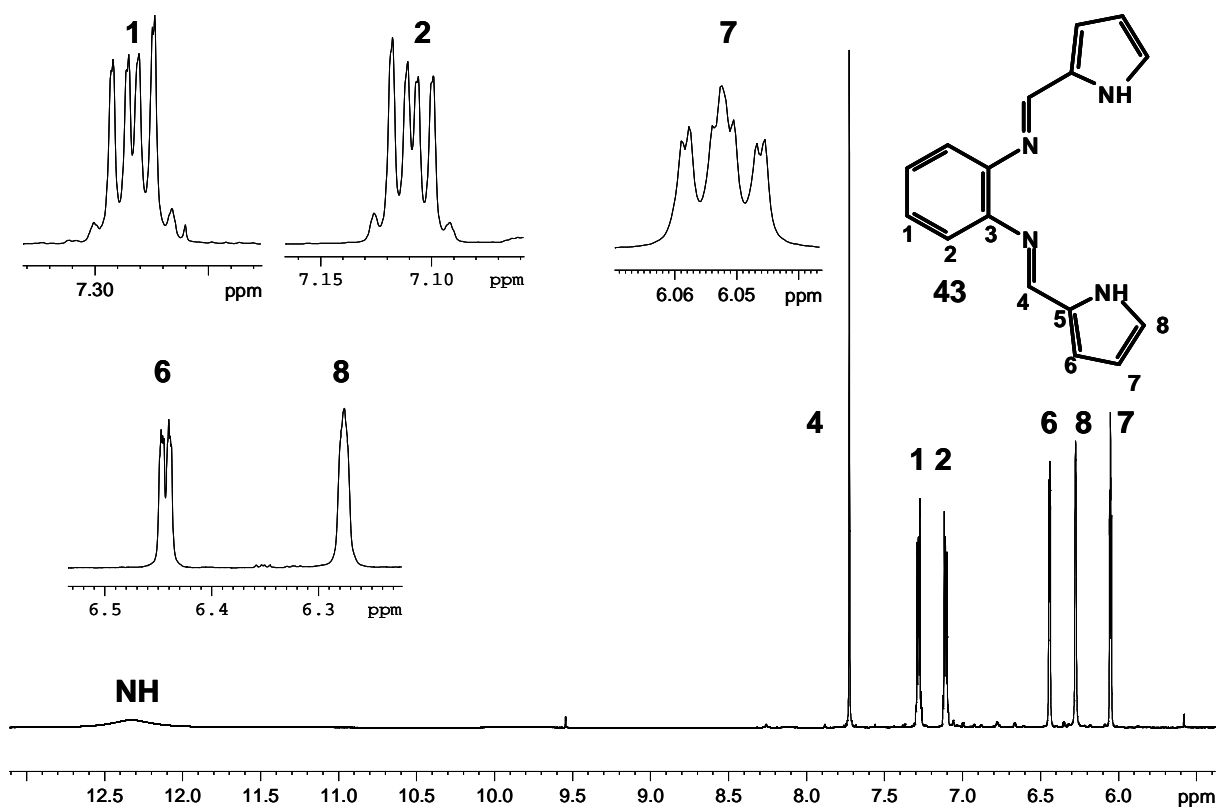
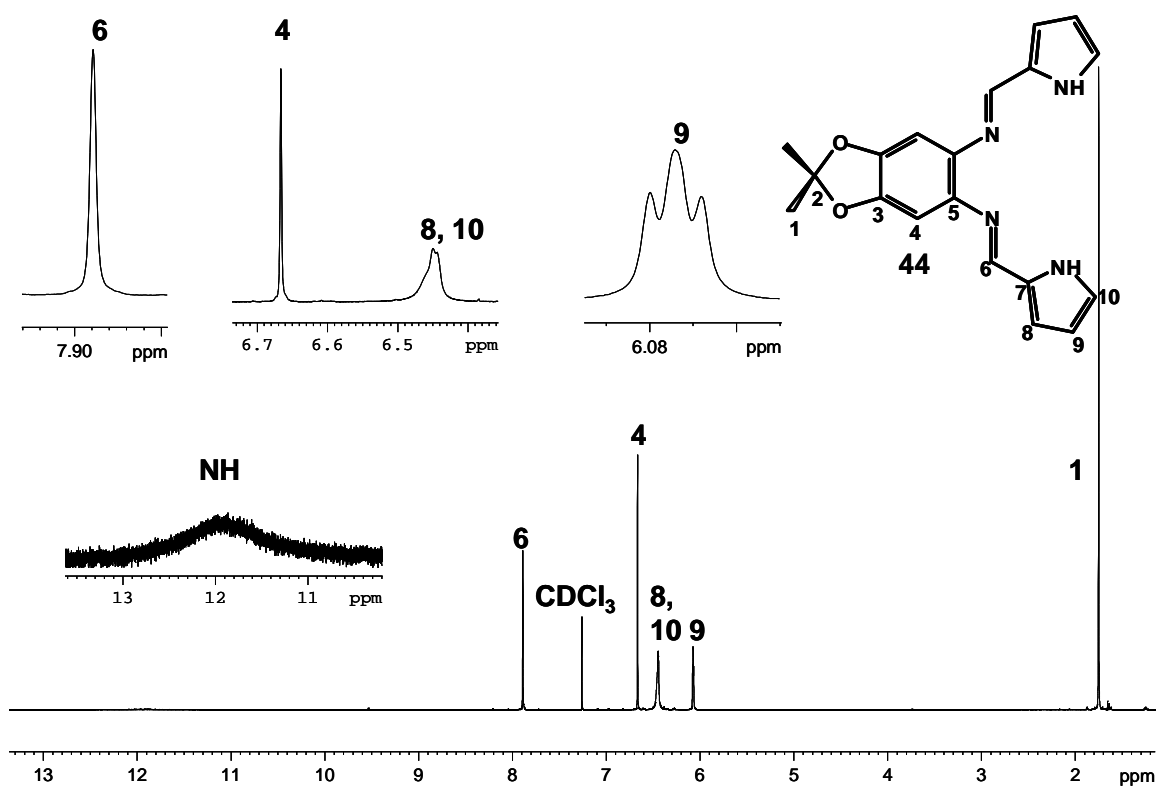
Tab. 3: Elementaranalyse der Eisen(III)-Komplexe Fe(III)17Cl bzw. Fe(III)15Cl

Fe(III)17Cl	% Fe	% C	% H
Berechnet	13.83	54.63	4.58
Gefunden	13.63	54.25	4.70
Fe(III)15Cl	% Fe	% C	% H
Berechnet	11.74	58.07	4.24
Gefunden	11.39	57.56	4.57

3.1.5 Synthese der Pyrrol-Liganden

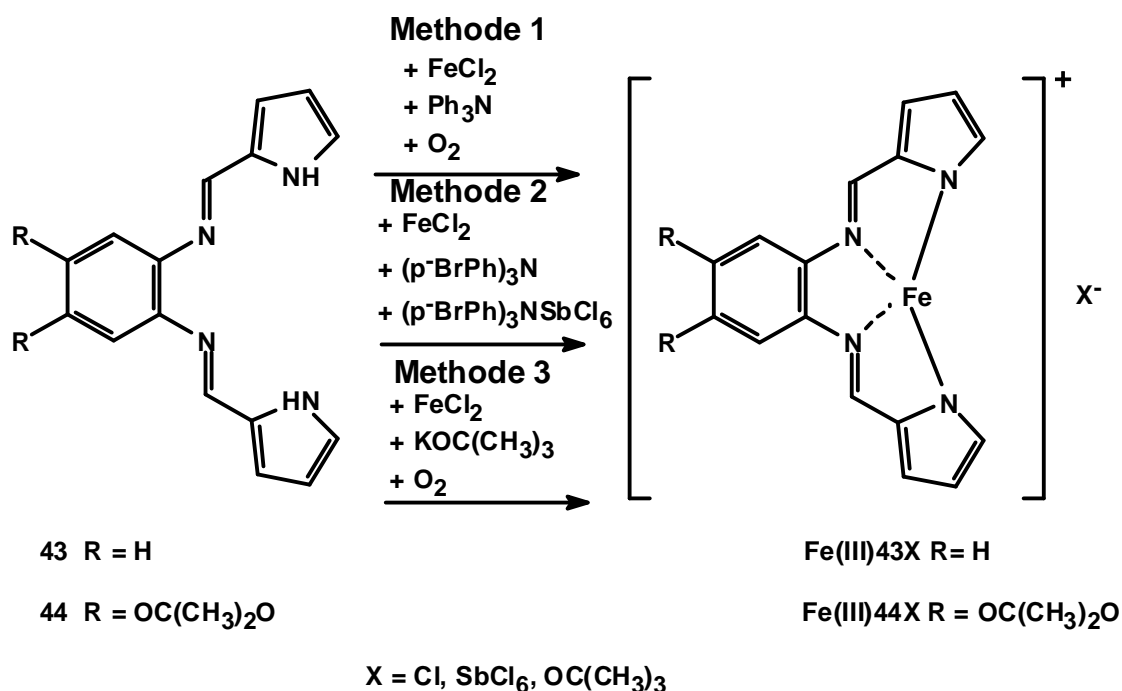
Da die bislang dargestellten Komplexe keine katalasemimetischen Eigenschaften aufweisen (s. Kapitel 4.1) und schwer zu reinigen sind, wurde das Ligandensystem variiert. Es wurde hierbei eine von Bérubé *et al.*^[54] beschriebene Reaktion verwendet. An die Stelle des 2-Aminobenzaldehyds **18** trat nun der Pyrrol-2-carbaldehyd **42**. Dieser ergab mit den Diaminen **21** bzw. **34** in einer mit Essigsäure katalysierten Reaktion in Ethanol die entsprechenden Diimine **43** bzw. **44**.^[46, 54] Diese ließen sich gut durch Umkristallisation aus Methanol bzw. durch Extraktion mit wenig Methanol reinigen. Dies zeigen auch die in Abb. 16 für **43** bzw. Abb. 17 für **44** abgebildeten ¹H-NMR Daten. Die Ausbeute von **43** lag bei 38 %, die von **44** bei 87 %. Zur vollständigen Charakterisierung wurden noch ESI-Massenspektren, UV/Vis- und IR-Spektren aufgenommen.



Abb. 16: ^1H -NMR von 43 in DMSO-d_6 Abb. 17: ^1H -NMR von 44 in DMSO-d_6

3.1.5.1 Synthese der Eisen(III)-Komplexe der Pyrrol-Liganden

Aus den Liganden **43** bzw. **44** wurden unter Anwendung verschiedener Komplexierungsmethoden die entsprechenden Eisen(III)-Komplexe **Fe(III)43X** bzw. **Fe(III)44X** synthetisiert. Es wurden zunächst die Eisen(II)-Komplexe unter Schutzgasatmosphäre hergestellt. Hierzu wurde Eisen(II)-chlorid mit drei Moläquivalenten der verwendeten Base in absolutem THF über Nacht gelöst. Als Basen wurden Triphenylamin (Methode 1) (Analog Lit.^[30, 44]), Tri-(p-bromphenyl)-amin (Methode 2) (Analog Lit.^[44]) und Kalium-tert.butanolat (Methode 3) (Analog Lit.^[61]) verwendet.



Eine Lösung des Liganden in absolutem THF wurde bei einer Temperatur von 60°C hinzugegotropft. Hierbei lag das Eisen(II)-chlorid minimal im Überschuss zum Liganden vor. Nach 30 minütigem Rühren bei 60°C wurde die Lösung abgekühlt und die Oxidation zum Eisen(III)-Komplex durchgeführt. Dies geschah außer bei Methode 2 durch Entfernen der Argonatmosphäre über der Reaktionsmischung durch Anlegen eines Wasserstrahlpumpenvakuums und anschließendem Belüften der Apparatur. Durch Rühren bei Raumtemperatur konnte so der Eisen(III)-Komplex hergestellt werden. Bei Methode 2 erfolgte die Oxidation durch radikalische Oxidation mit Tris(p-bromphenyl)aminiumhexachloroantimonat unter Argon.^[44]

Die Isolierung des Eisen(III)-Komplexes erfolgt in allen Fällen durch Einengen der Lösung auf das halbe Volumen und Abfiltrieren des Feststoffes über eine D4-Fritte unter Schutzgas.

Die Eisen(III)-Komplexe **Fe(III)43X** bzw. **Fe(III)44X** wurden über ihre Eisenanalyse (Tab. 4) analysiert.

Tab. 4: Eisenanalysen der nach den Methoden 1-3 hergestellten Komplexe Fe(III)43X bzw. Fe(III)44X (X= Cl, SbCl₆, OC(CH₃)₃)

Methode	1: Fe(III)43Cl	2: Fe(III)43SbCl₆·2 THF	3: Fe(III)43OC₄H₉
% Fe berechnet:	15.88	7.36	13.12
%Fe gefunden	39.75	5.74	12.53
Methode	1: Fe(III)44Cl	2: Fe(III)44SbCl₆·2 THF	3: Fe(III)44OC₄H₉
% Fe berechnet:	15.88	6.44	12.11
%Fe gefunden	45.56	5.11	12.36

Hierbei zeigte sich über die Elementaranalysen (Tab. 4), dass die Komplexierungen mit Kalium-tert.butanolat als Base, um die Liganden zu deprotonieren, gute Ergebnisse lieferten, da bei den Methoden 1 und 2 die Elementaranalysen weit von den berechneten Werten abweichen und auch in den ESI-Massenspektren kein Komplex nachgewiesen werden kann. Die so nach Methode 3 erhaltenen Eisen(III)-Komplexe enthielten jedoch noch Lösungsmittelreste, die auch durch längeres Trocknen im Ölpumpenvakuum nicht entfernt werden konnten. Die ESI-Spektren (Abb. 18 für **Fe(III)43OC(CH₃)₃** und Abb. 19 für **Fe(III)44 OC(CH₃)₃**) und der Vergleich der UV/VIS-Spektren von Ligand und Komplex (Abb. 20) zeigen, dass der Komplex entstanden ist. Die spezifischen UV/Vis-Banden des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs bei 310 nm und des $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs bei 400 bzw. 370 nm der Ligandenspektren verschoben sich durch die Komplexierung des Eisens in ihren Maxima um 20 nm auf 280 nm und 370 bzw. 340 nm. Die Intensitäten nahmen hierbei auch leicht ab.

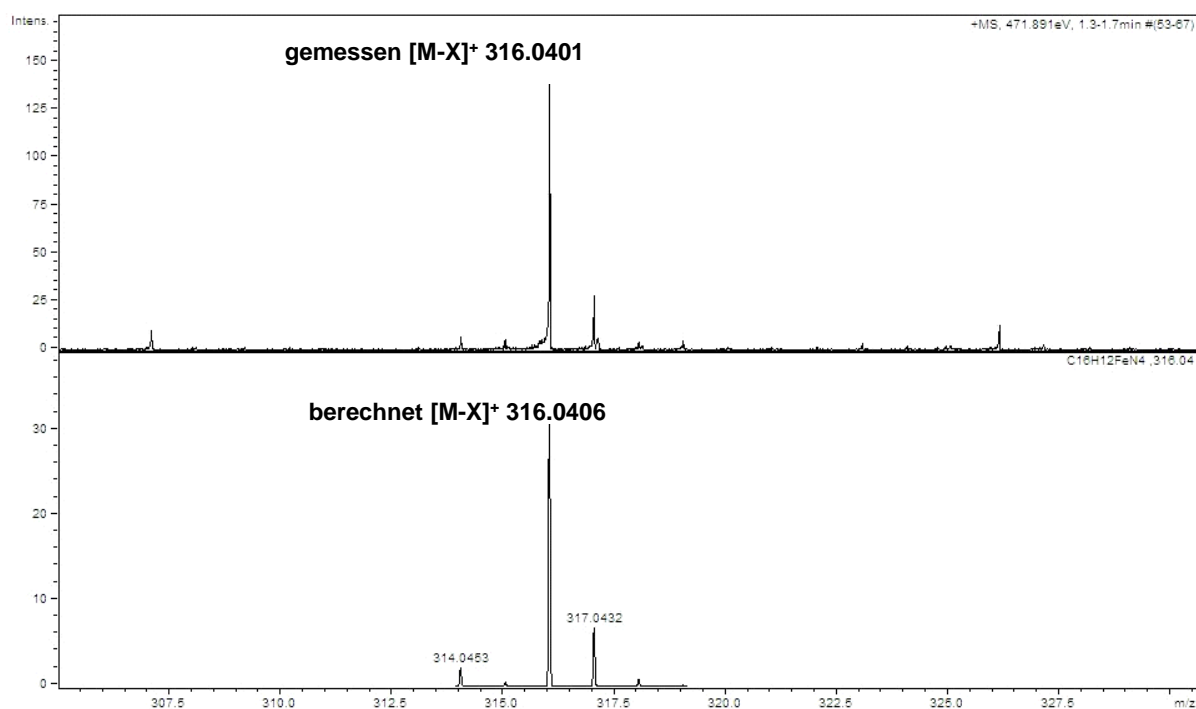


Abb. 18: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von Fe(III)43 nach Methode 3

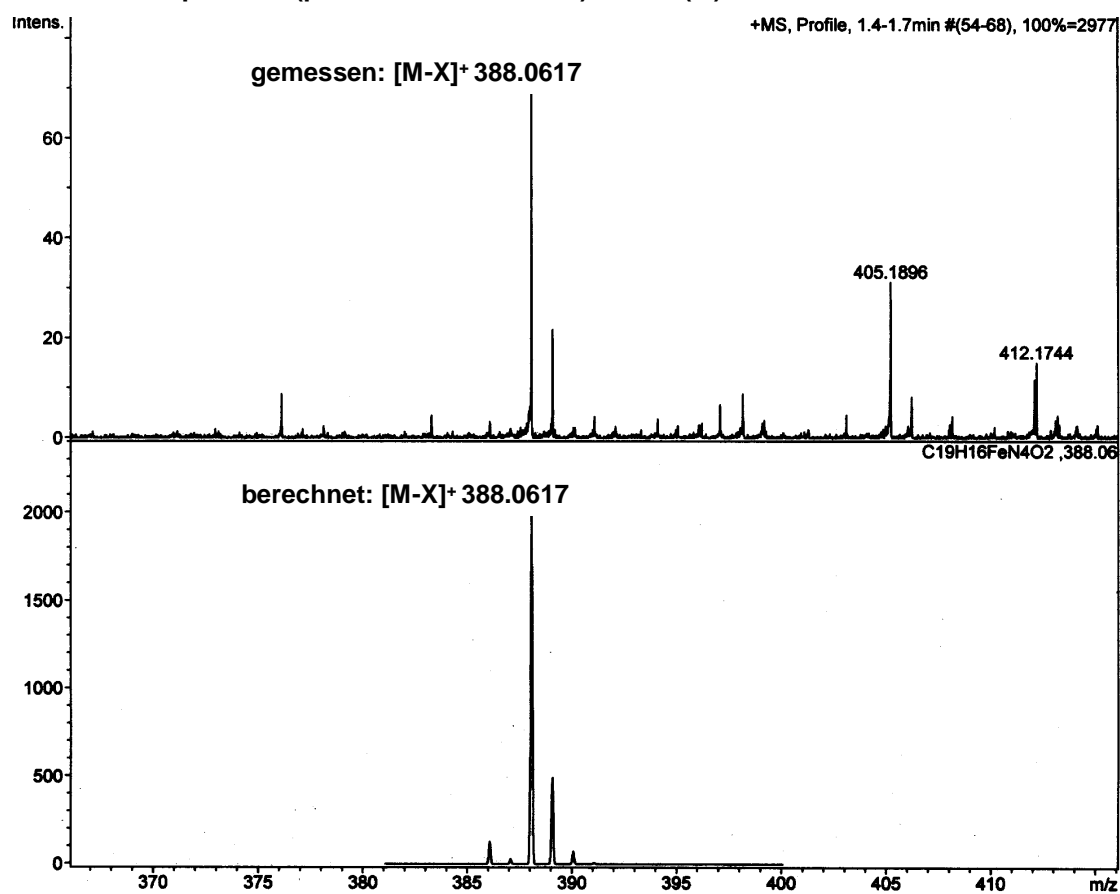


Abb. 19: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von Fe(III)44 nach Methode 3

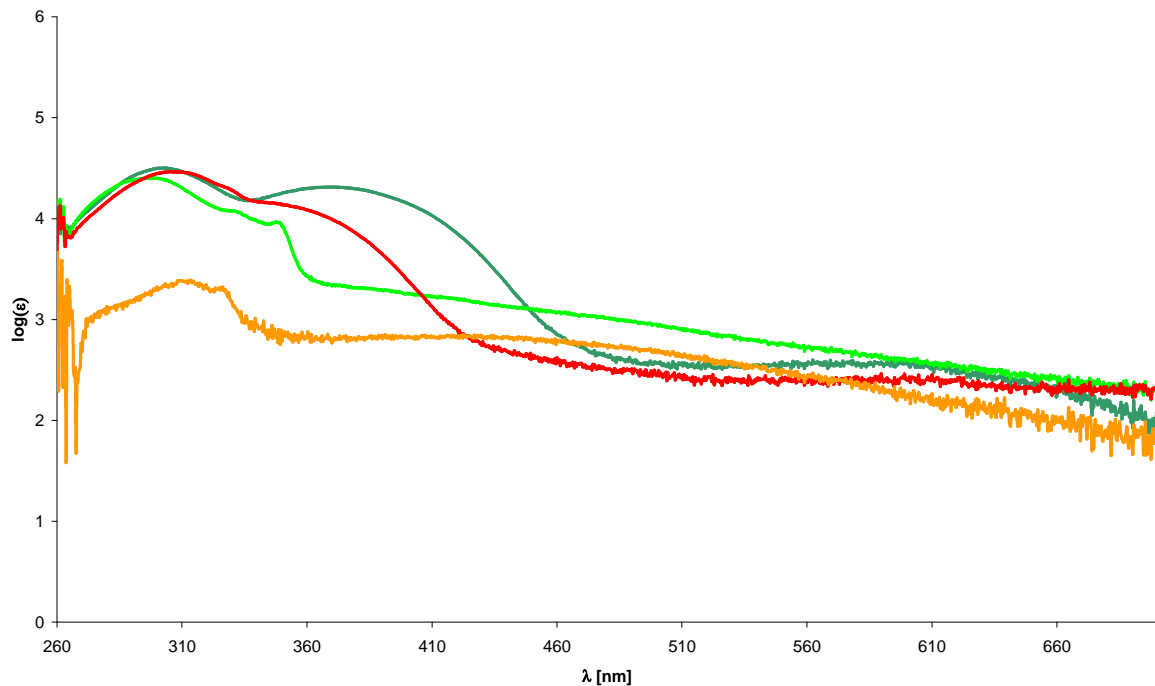


Abb. 20: UV/Vis - Spektrum von 43 (dunkelgrün), 44 (rot), Fe(III)43OC(CH₃)₃ (grün) und Fe(III)44OC(CH₃)₃ (orange) in DMF

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine Komplexierung des Eisens nur mit tert. Butanolat stattgefunden hat. Zusätzlich wurden noch ESR-Spektren im Festkörper und in DMSO aufgenommen, um Aussagen über den Spin-Zustand treffen zu können. Die ESR – Spektren zeigen, dass es sich bei dem Komplex um einen high-spin-Eisen(III)-Komplex (g-Faktor: $g=4.44$ entspricht dem Literaturwert^[4] für high-spin-Eisen(III) von $g \approx 4.3$) mit einem nur sehr geringen Anteil an low-spin-Eisen(III) (g-Faktor: $g=2.02$ entspricht dem Literaturwert^[4] für low-spin-Eisen von $g \approx 2.0$) handelt (Abb. 21).

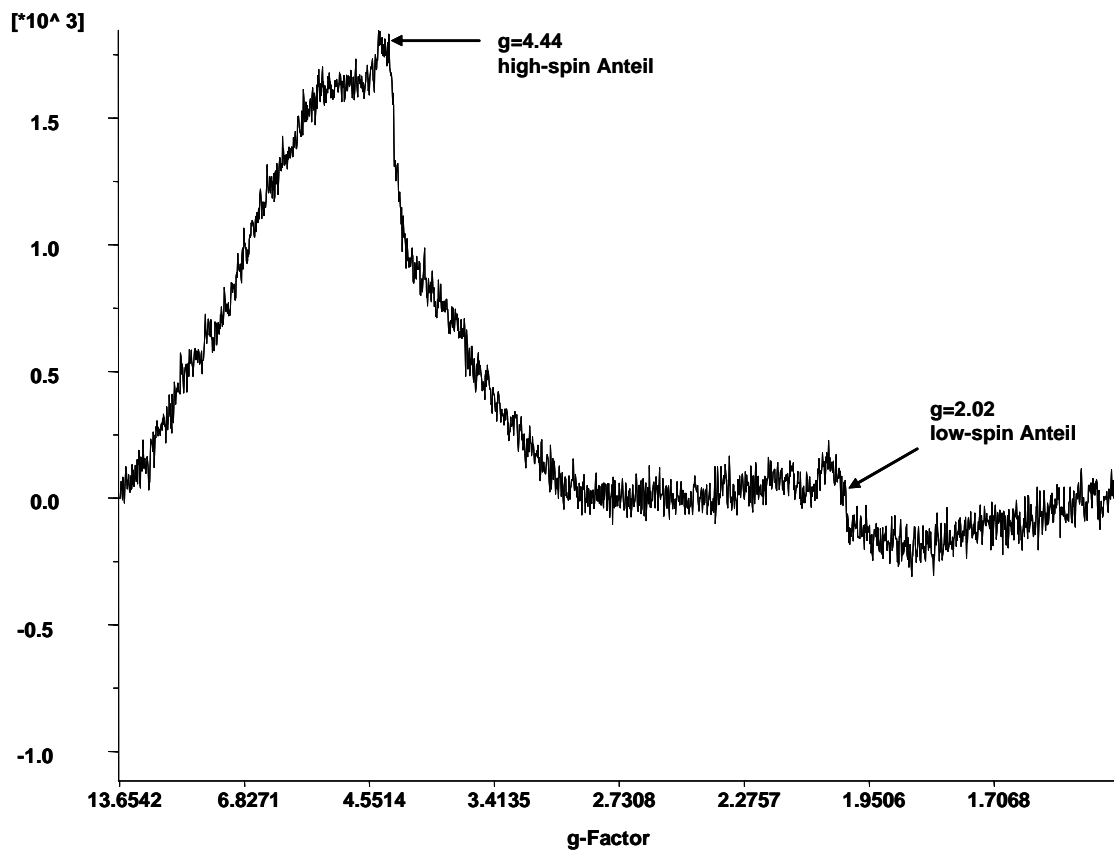
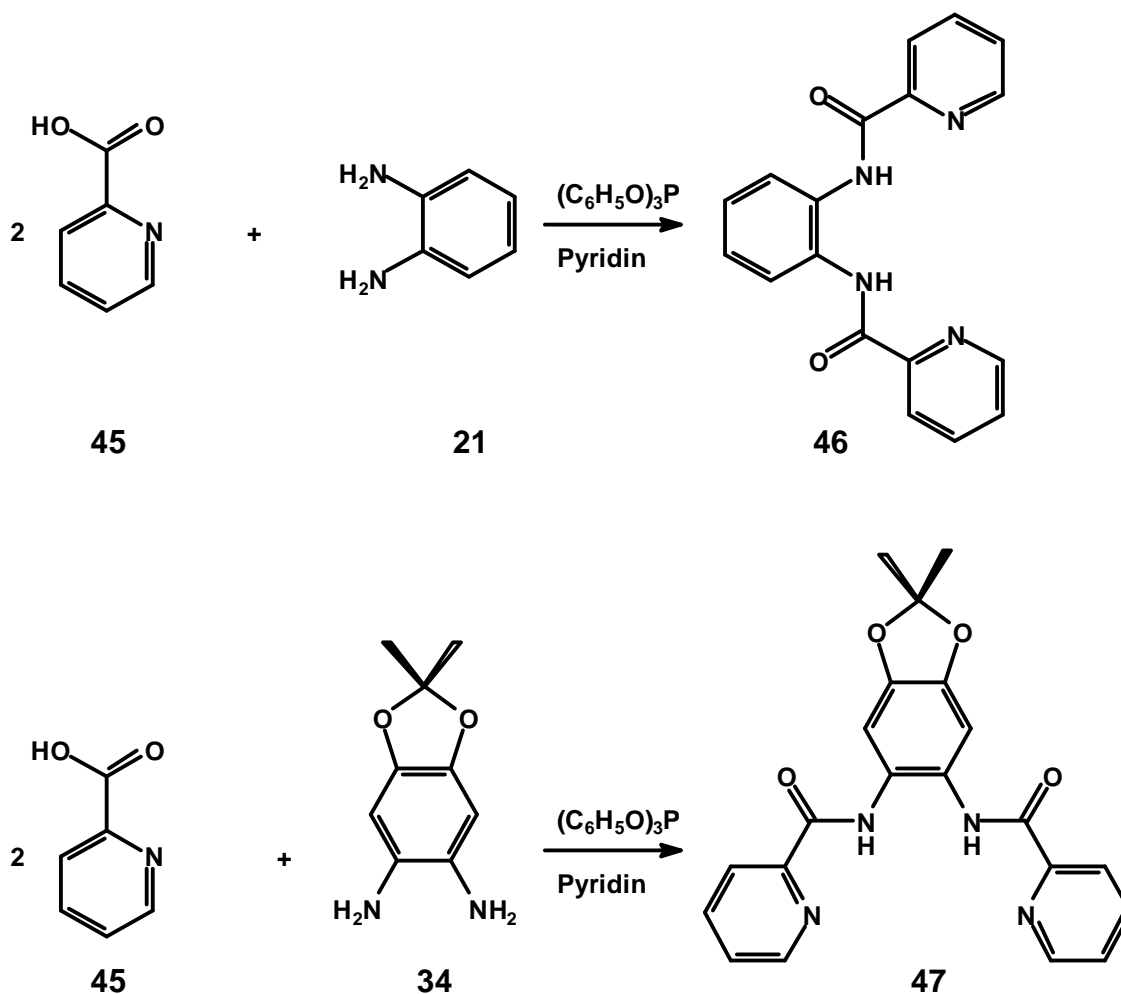


Abb. 21: ESR-Spektrum von $\text{Fe(III)}_4\text{3OC(CH}_3)_3$ im Festkörper bei 77 K

Die Komplexe wurden hinsichtlich ihrer enzymmimetischen Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Kapitel 4.1 dargestellt. Da die Komplexe jedoch keine katalasemimetische Aktivität zeigen, wurde das Ligandensystem erneut verändert.

3.1.6 Synthese der Picolinsäureamid-Liganden

Als weitere Liganden wurden analog einer von Vagg *et al.*^[62] beschriebenen Amidsynthese aus Picolinsäure **45** und den Diaminen **21** bzw. **34** die entsprechenden Diamide synthetisiert. Hierbei wurde die freie Säure in trockenem Pyridin mit dem Diamin auf 100°C erhitzt und in der Hitze Triphenylphosphit hinzugesetzt, so dass aus dem Carboxylat der Picolinsäure intermediär der aktivierte Picolinsäurephenylester gebildet werden konnte, der dann mit einer Aminogruppe des Diamins unter Addition - Eliminierung innerhalb von 4 Stunden bei 100°C zum Diamid **46** bzw. **47** reagierte. Beim Abkühlen der Reaktionslösung fielen leicht gelbliche Flocken aus, so dass diese abgesaugt und mit etwas kaltem Chloroform gereinigt werden konnten. Die Ausbeuten lagen bei 52 % für **46** und bei 63 % für **47**.



Die ^1H -NMR – Analysen der Liganden **46** und **47** (Abb. 22 und Abb. 23) zeigten nur noch sehr geringe Verunreinigungen durch Pyridin und Dichlormethan, so dass sie nur im Hochvakuum getrocknet werden mussten. Zur vollständigen Charakterisierung wurden noch ESI-Massenspektren IR- und UV-Vis-Spektren der Verbindungen aufgenommen.

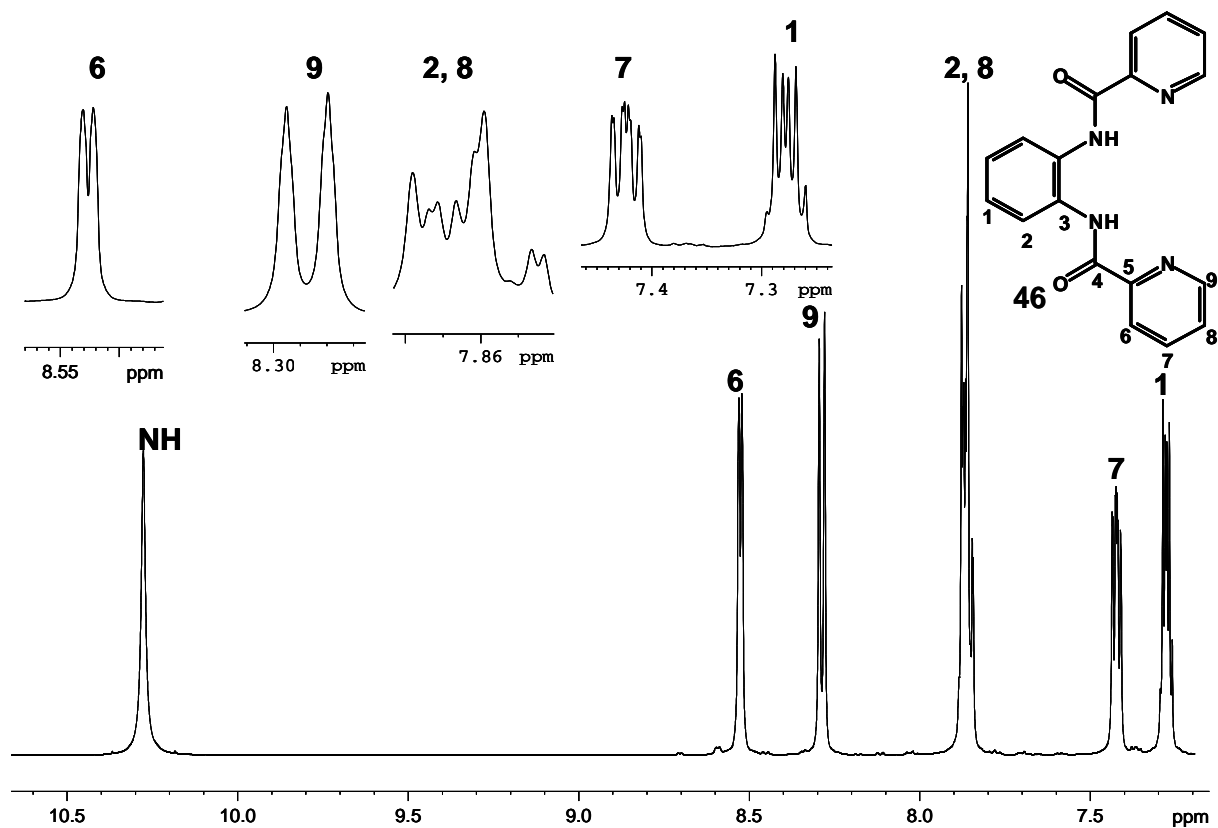
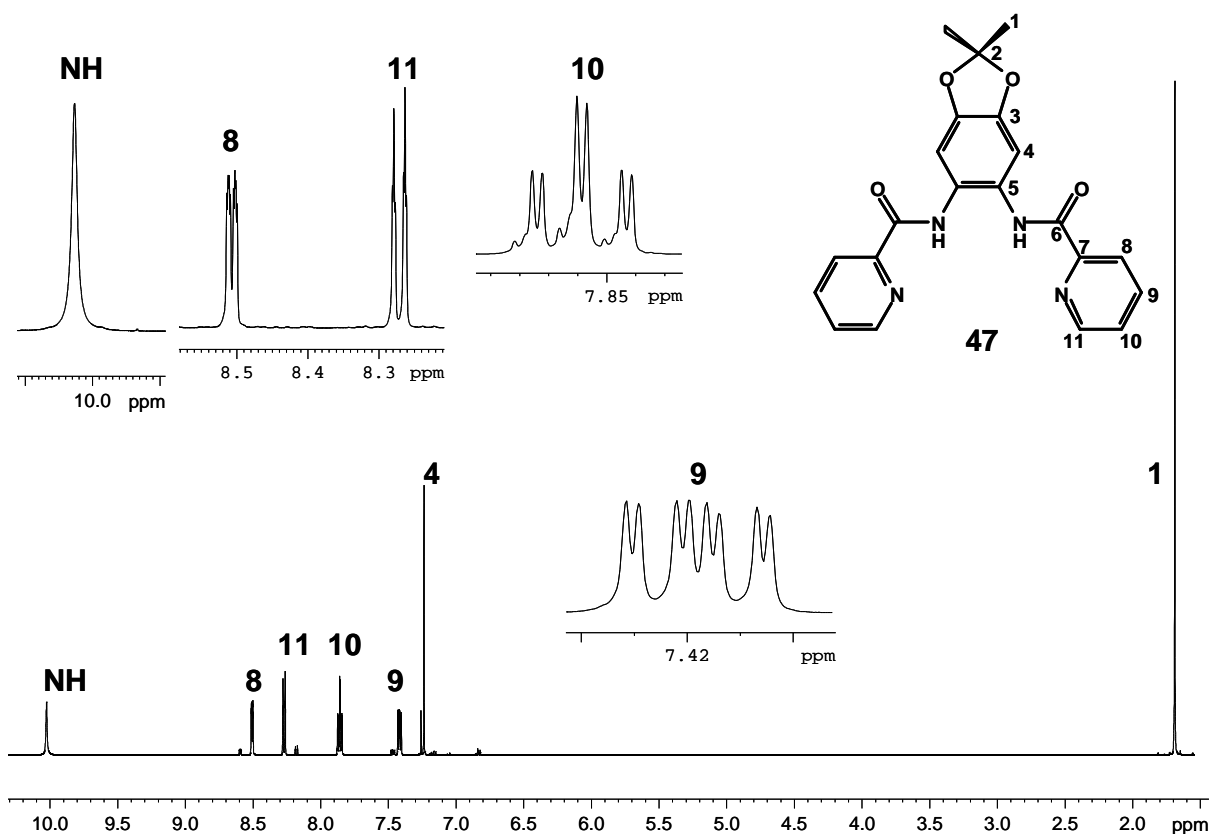
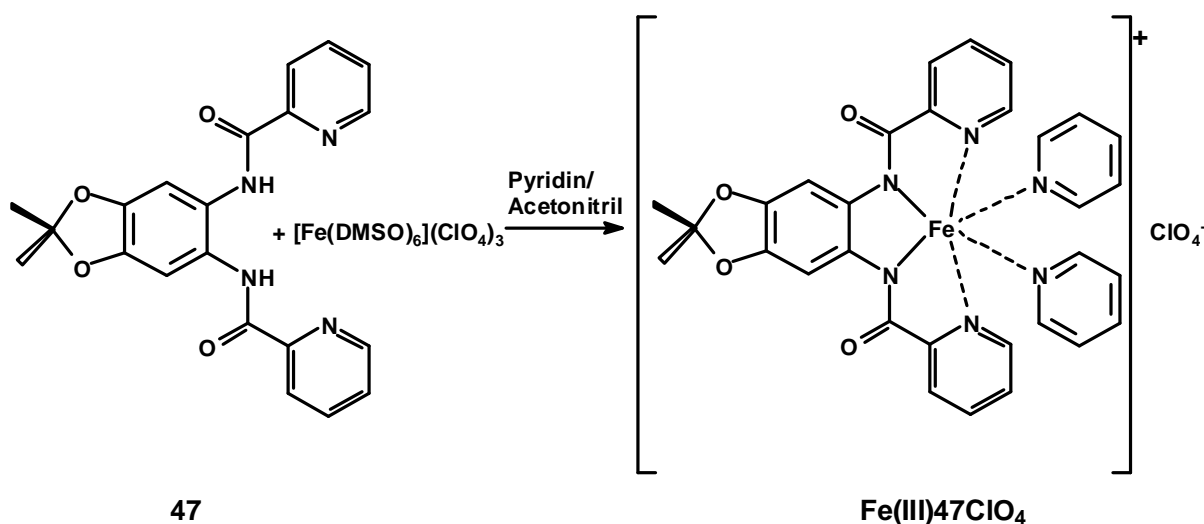
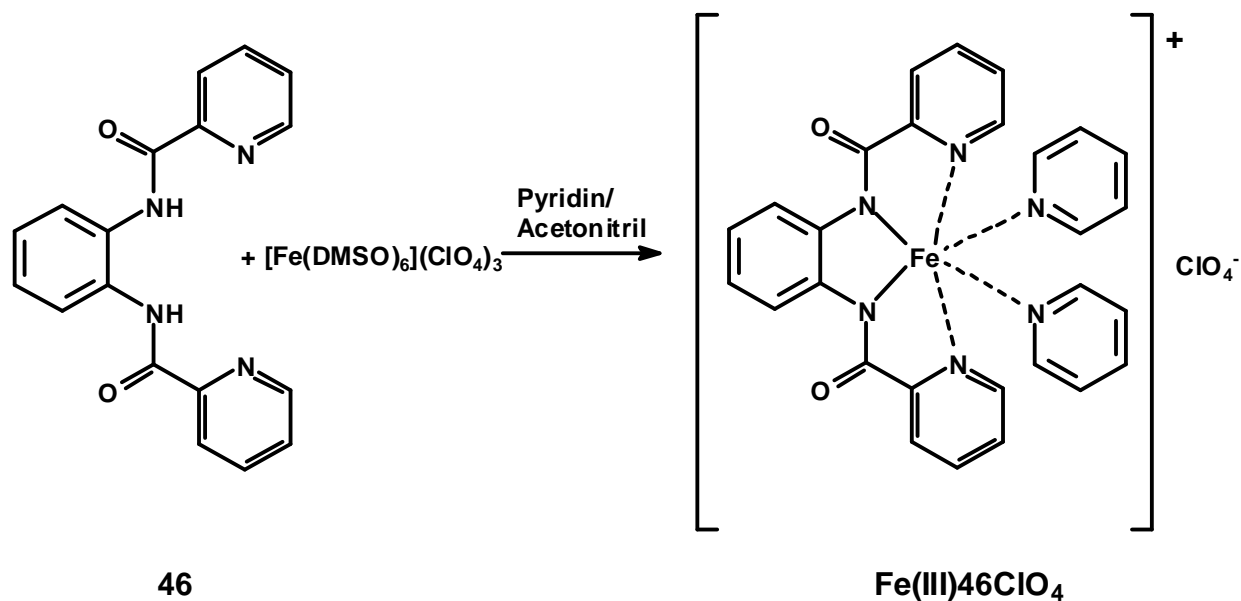


Abb. 22: ^1H -NMR von **46** in CDCl_3

Abb. 23: ^1H -NMR von **47** in CDCl_3

3.1.6.1 Synthese der Eisen(III)-Komplexe der Picolinsäureamid-Liganden

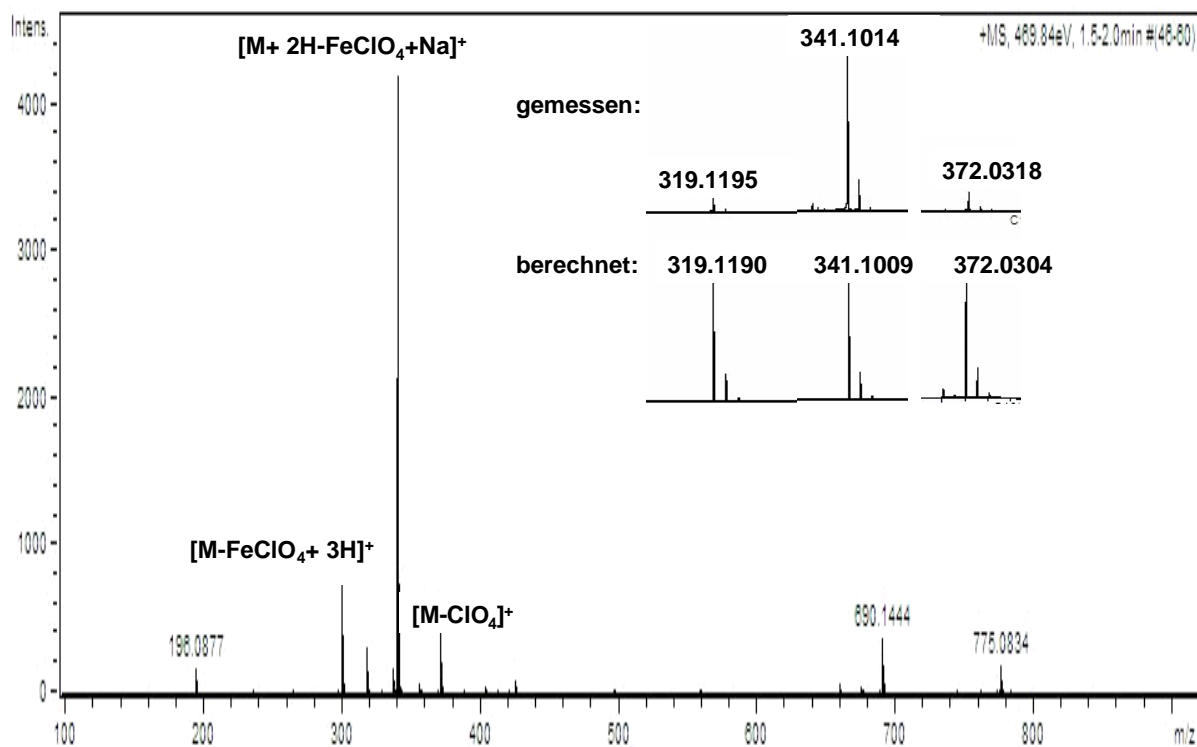
Die Komplexierung des Eisen(III) durch die Picolinsäureamid – Liganden erfolgte analog einer Literaturvorschrift von Ray *et al.*^[63]. Als Eisen-Salz wurde Eisen(III)-hexa-(dimethylsulfoxido)-perchlorat, das durch Ausfällen mittels Zugabe von DMSO zu einer Lösung von Eisen(III)-perchlorathexahydrat in Aceton hergestellt wurde^[29, 64], eingesetzt. Zur Umsetzung wurde jeweils der Ligand **46** bzw. **47** in einem Gemisch aus trockenem Acetonitril und trockenem Pyridin vorgelegt und unter Schutzgas mit einer Suspension des $[\text{Fe}(\text{DMSO})_6](\text{ClO}_4)_3$ Salzes in trockenem Acetonitril versetzt. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur und anschließendem Abkühlen der Lösung im Kühlschrank konnten die Eisen(III)-Komplexe **Fe(III)46ClO₄** und **Fe(III)47ClO₄** isoliert werden. Das in der Lösung vorhandene Pyridin besetzte hierbei jeweils die fünften und sechsten Koordinationsstellen des Eisens, so dass das Eisen(III)-ion in den Komplexen oktaedrisch koordiniert vorliegt.



Zur Charakterisierung der Komplexe wurde per Elementaranalyse der Eisengehalt der Komplexe überprüft. Dieser stimmte sehr gut mit dem Wert für den mit zwei zusätzlichen Pyridinliganden versehenem Komplex überein (Tab. 5). Zusätzlich wurden ESI-Massenspektren (Abb. 24 und Abb. 25), sowie der Vergleich der UV/Vis-Spektren (Abb. 26) von Ligand und Komplex zum Nachweis einer Komplexbildung herangezogen. Die Ausbeuten betrugen 77% für **Fe(III)46ClO₄ · 2 Pyridin** und 78 % für **Fe(III)47ClO₄ · 2 Pyridin**.

Tab. 5 : Eisengehalt der Komplexe Fe(III)46ClO_4 und Fe(III)47ClO_4

	$\text{Fe(III)46ClO}_4 \cdot 2 \text{ Pyridin}$	$\text{Fe(III)47ClO}_4 \cdot 2 \text{ Pyridin}$
% Fe berechnet	8.87 %	7.96 %
% Fe gefunden	8.62 %	8.20 %

Abb. 24: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von Fe(III)46ClO_4 (Es sind Signale vom Komplex $[\text{M}-\text{ClO}_4]^+$ und vom Liganden $[\text{M}-\text{FeClO}_4 + 3\text{H}]^+$ und $[\text{M} + 2\text{H}-\text{FeClO}_4 + \text{Na}]^+$ vorhanden)

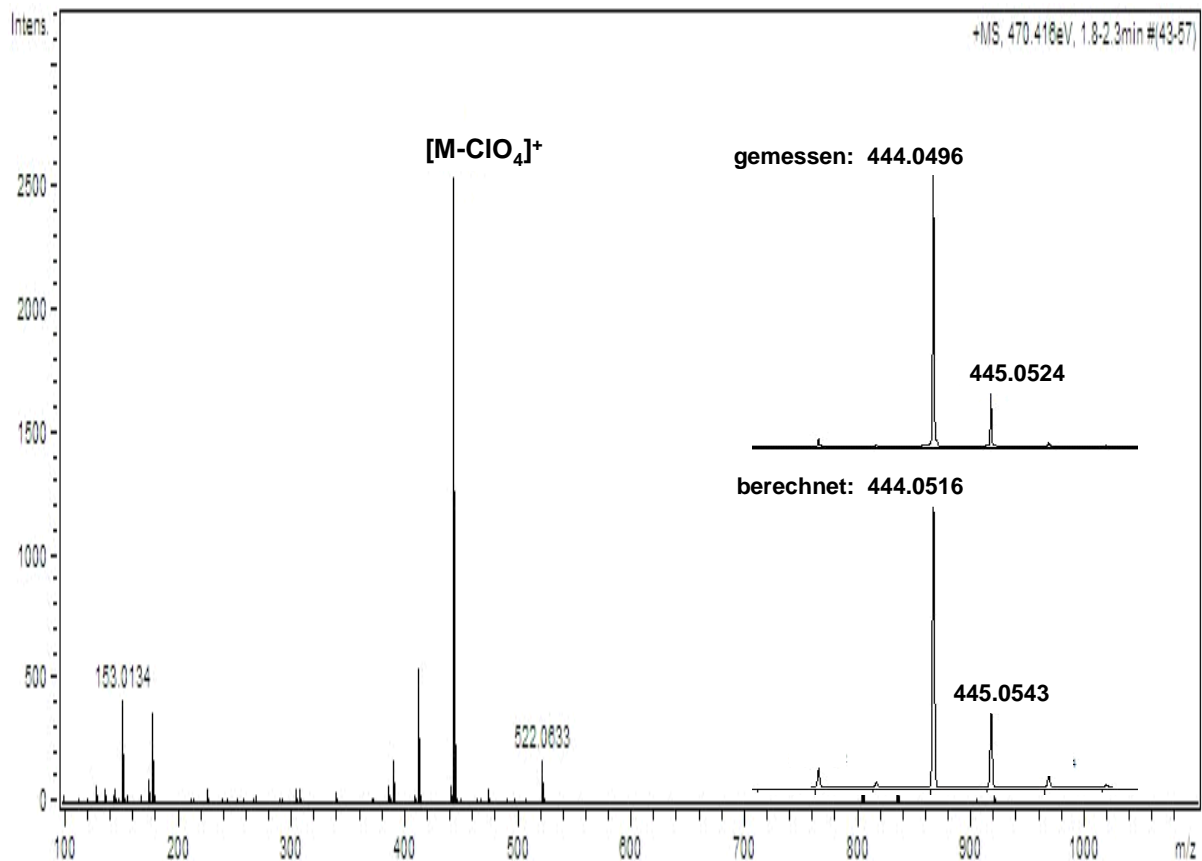


Abb. 25: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von $\text{Fe(III)}47\text{ClO}_4$

Die ESI-Spektren zeigen deutlich, dass eine Komplexierung stattgefunden hat, da das Signal für den Komplex ohne das Perchlorat-Gegenion auftritt $[\text{M}-\text{ClO}_4]^+$. Im Fall von **$\text{Fe(III)}46\text{ClO}_4$** sind zusätzlich noch Liganden-Signale $[\text{M}-\text{FeClO}_4 + 3 \text{H}]^+$ und $[\text{M} + 2\text{H} - \text{FeClO}_4 + \text{Na}]^+$ zu sehen.

Beim Vergleich der UV/Vis-Spektren von Ligand und Komplex fällt auf, dass die Bande des $n \rightarrow \pi^*$ - Übergangs bei 310 nm aus dem Ligandenspektrum im Spektrum des Komplexes nicht mehr zu sehen ist (Abb. 26).

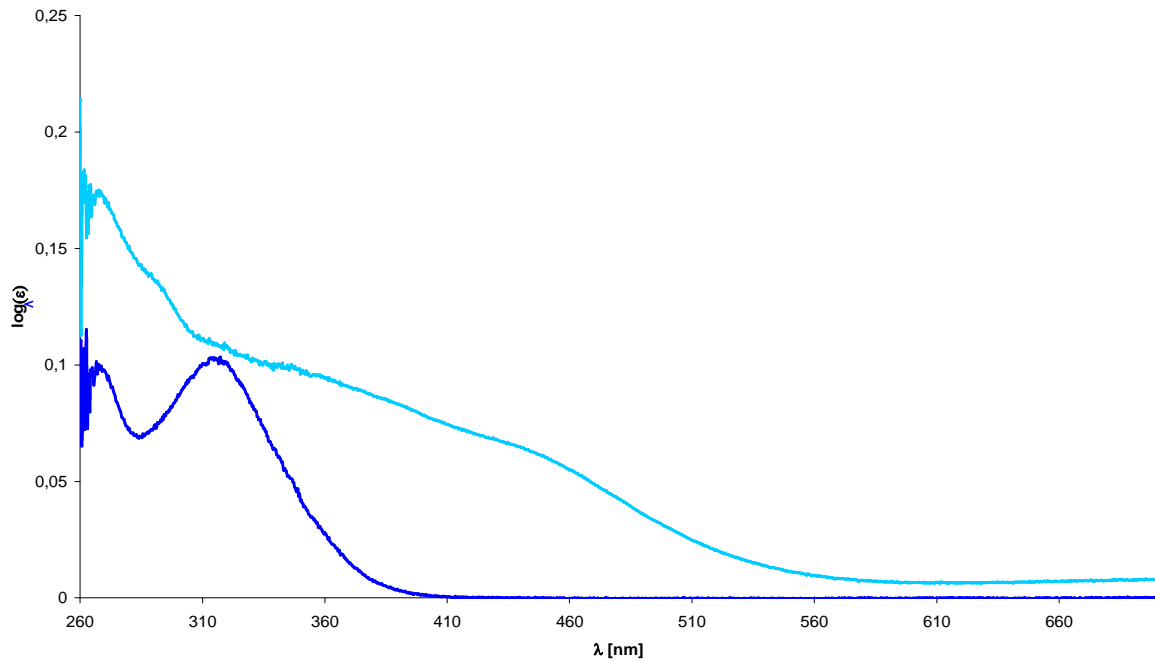


Abb. 26: UV/Vis-Spektren vom 51 und $\text{Fe(III)}_{46}\text{ClO}_4$ 10 μM in DMF

Es wurden auch ESR – Spektren im Festkörper und in DMSO aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass im Feststoff ein reiner low-spin Komplex (g-Faktoren: $g_z=1.94$ $g_y=2.18$ $g_x=2.26$ entsprechen den Literaturwerten für Eisen(III)-low-spin-Komplexe^[4] von $g_z \approx 1.8$ $g_y \approx 2.2$ $g_x \approx 2.4$) (Abb. 27) erhalten wurde, da zwei starke Liganden an 5. und 6. Koordinationsstelle gebunden sind.

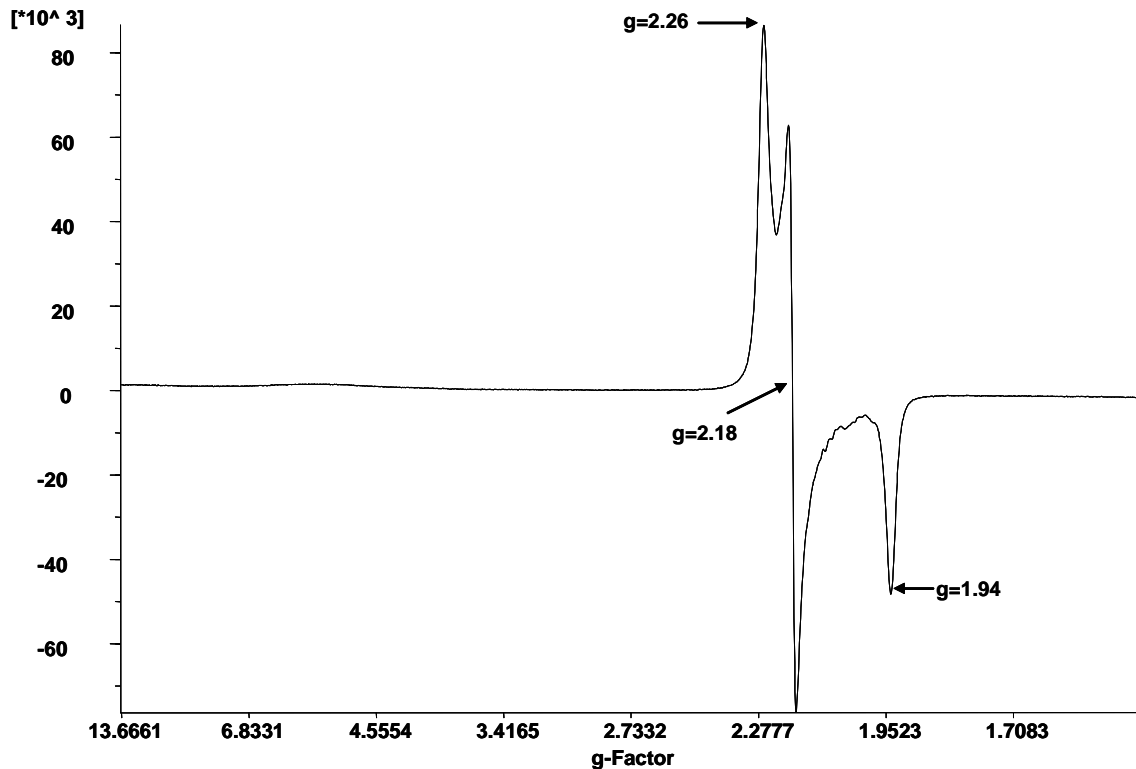


Abb. 27: ESR-Spektrum von $\text{Fe(III)}_{46}\text{ClO}_4 \cdot 2 \text{ Pyridin}$ bei 77 K im Festkörper

Messungen in DMSO bei 77 K zeigen jedoch, dass diese bereits von den schwachen Liganden DMSO verdrängt werden. Dies führte zur Ausbildung eines Gemisches aus low- (g-Faktoren: $g_z=1.94$ $g_y=2.18$ $g_x=2.26$) und high-spin (g-Faktoren: $g=4.48$ entspricht dem Literaturwert von $g \approx 4.3$ für Eisen(III)-high-spin-Komplexe^[4]) Spezies (Abb. 28).

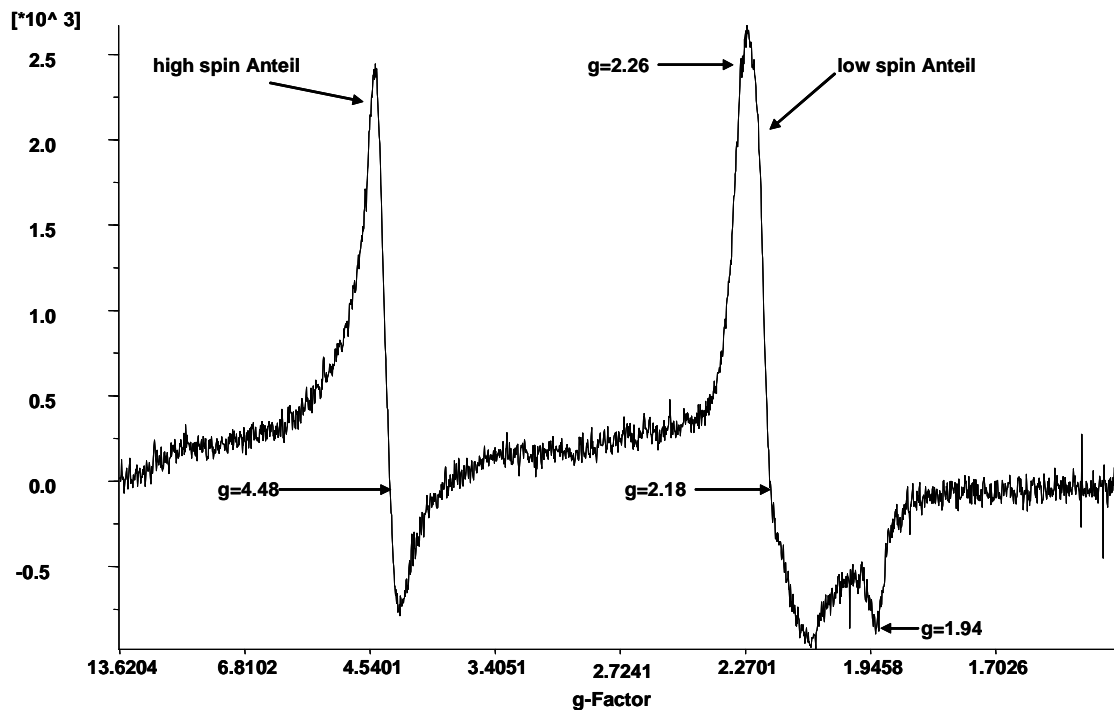


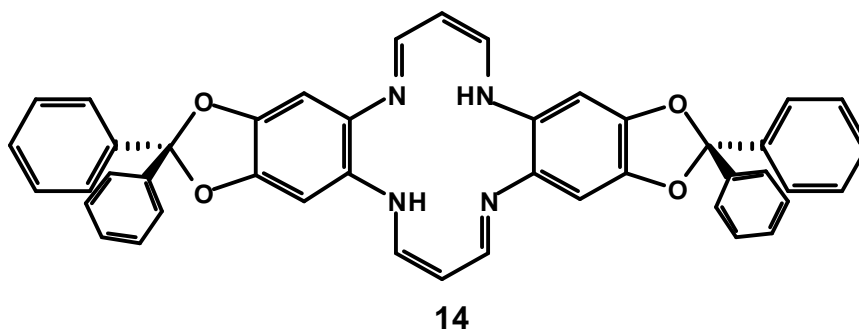
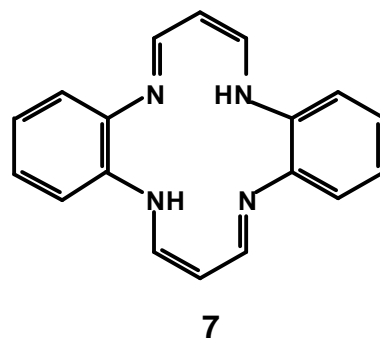
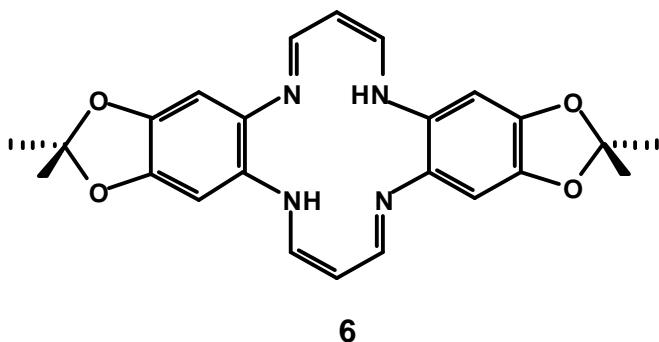
Abb. 28: ESR-Spektrum von $\text{Fe(III)}_{46}\text{ClO}_4 \cdot 2\text{Pyridin}$ 3 mM in DMSO Matrix bei 77 K

Der Spin - Zustand in wässriger Lösung konnte aus messtechnischen Gründen nicht bestimmt werden, da die Komplexe für eine Messung bei Raumtemperatur nicht genug löslich waren.

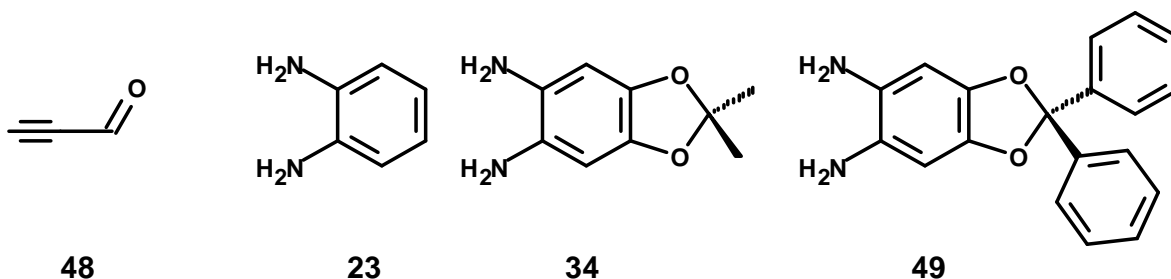
Die Eisen(III)-Komplexe wurden hinsichtlich ihrer enzymmimetischen Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.1 dargestellt.

3.2 Synthese der TAA- Liganden

Für die Synthese der makrocyclischen Tetraaza[14]-annulen-Liganden **6**^[30, 31], **7**^[30-32] und **14**^[30, 31] wurde auf die von Baute beschriebenen Methoden zurückgegriffen.

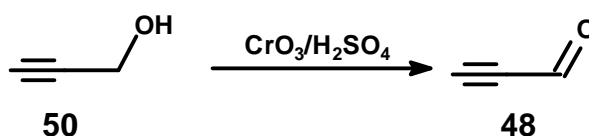


Hierzu wurden zunächst das Propinal **48** nach der Methode von Sauer^[65] und die Diamine **34** und **49** als Vorstufe der Zyklisierung dargestellt. Das käufliche 1,2-Phenyldiamin **23** wurde lediglich durch Sublimation im Ölpumpenvakuum gereinigt und unter Schutzgas im Dunkeln gelagert. Die Darstellung des Diamins **39** erfolgte auf die in Kapitel 3.1.3 beschriebene Weise.^[30, 34, 56]



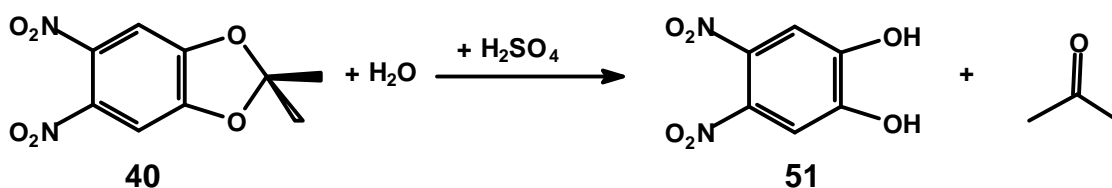
3.2.1 Synthese von Propinal nach Sauer^[65]

Das Propinal **48** wurde durch Oxidation von Propin-3-ol **50** in wässriger Lösung mit Chrom(VI)-oxid und Schwefelsäure bei 0-5°C hergestellt und während der Reaktion unter vermindertem Druck von 70 hPa und gleichzeitigem schwachen Argonstrom kontinuierlich abkondensiert. Das Rohprodukt wurde in zwei in Reihe geschalteten Kühlfallen aufgefangen. Die erste Kühlfalle wurde mit einer Eis/Kochsalz-Kältemischung auf -5°C, die zweite mit einer Aceton/Trockeneis-Mischung auf -78°C gekühlt. Das rote Rohprodukt wurde anschließend über eine Vigreux-Kolonne fraktionierend destilliert. Die Ausbeute an farblosem Propinal betrug 34 %, die Reinheit wurde per ¹H-NMR überprüft.

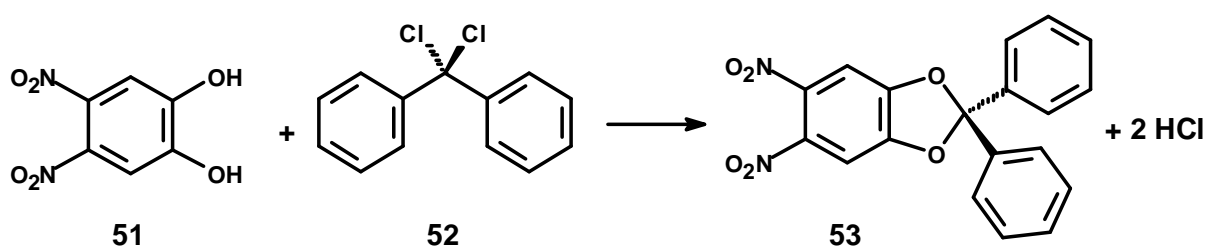


3.2.2 Synthese von 5,6-Diamino-2,2-diphenylbenz-1,3-dioxol

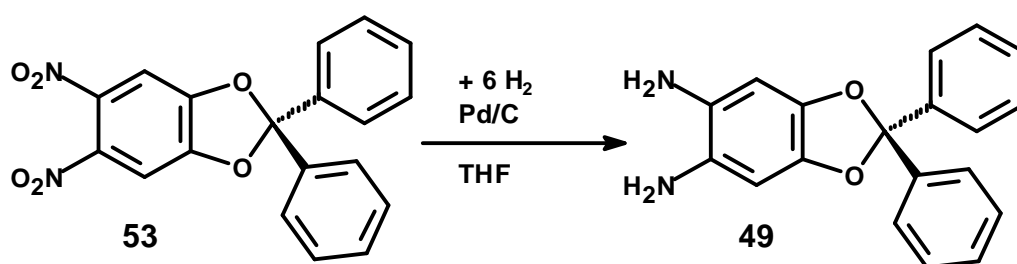
Zur Synthese des 2,2-Diphenyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamins **49** wurde das 2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-1,3-benzdioxol **40** eingesetzt. Mittels konzentrierter Schwefelsäure wurde das Acetal in Eiswasser hydrolysiert und das 4,5-Dinitro-benz-1,2-diol **51** mittels kontinuierlicher Extraktion mit Ether aus der Lösung isoliert. Die Ausbeute an **51** lag hierbei bei 92 %. Die Reinheit wurde mittels ¹H-NMR überprüft.^[30]



Anschließend wurde das 4,5-Dinitro-benz-1,2-diol **51** mit α,α -Dichlordiphenylmethan **52** bei 170°C eine halbe Stunde gekocht und das dabei entstandene HCl-Gas durch einen kontinuierlichen Argonstrom ausgetrieben. Das 5,6-Dinitro-2,2-diphenyl-1,3-benzdioxol **53** konnte durch Zugabe von wenig absolutem Ethanol rekristallisiert werden. Durch Nachwaschen mit kaltem Ethanol wurden letzte Verunreinigungen entfernt und nach dem Trocknen des Feststoffes im Ölpumpenvakuum eine Ausbeute von 75 % erzielt.^[30]

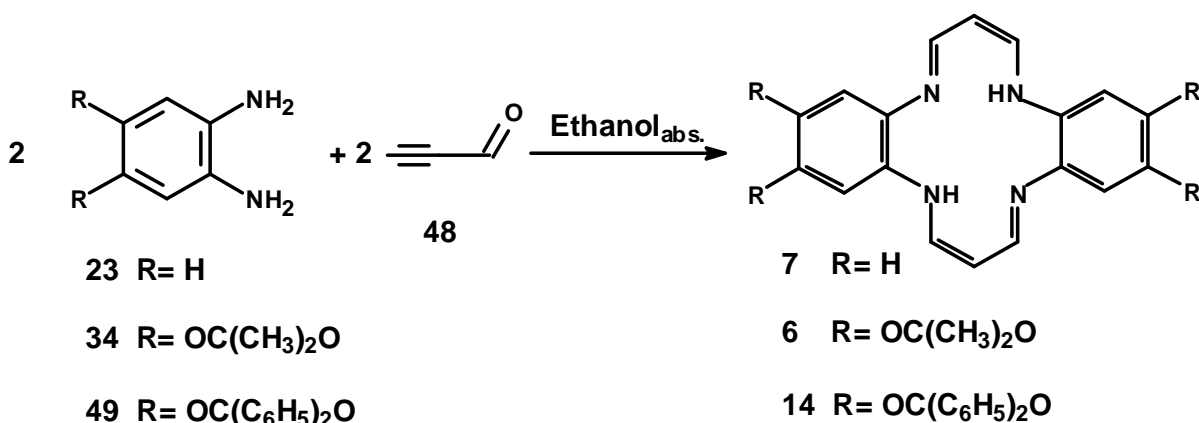


Durch Reduktion von **53** mit elementarem Wasserstoff bei $7 \cdot 10^5$ Pa im Laborautoklaven unter Verwendung von 10 % Palladium auf Aktivkohle in THF wurde schließlich das 2,2-Diphenyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin **49** hergestellt. Nach dem Abkondensieren des Lösungsmittels lag die Ausbeute bei 98 %.



3.2.3 Zyklisierung

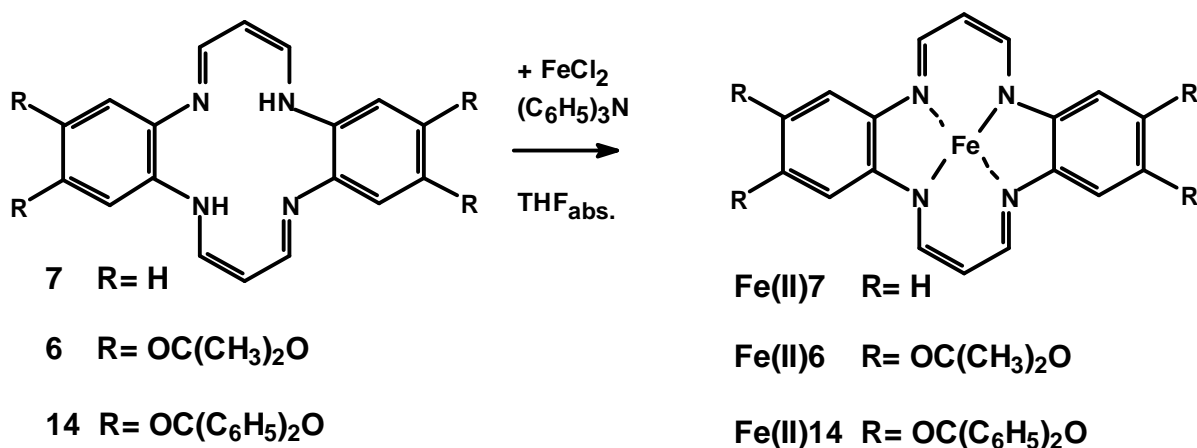
Die Darstellung der Makrozyklen erfolgte durch Umsetzung von Propinal **48** mit dem entsprechenden Diamin **23**, **34** bzw. **49** in absolutem, mit Argon gespülten Ethanol unter Schutzgas.^[30]



Eine ethanolische Lösung des Diamins **23**, **34** bzw. **49** wurde jeweils unter Schutzgas vorgelegt und auf 40°C erwärmt. In der Wärme wurde dann eine Lösung des Aldehyds **48** in wenigen Millilitern des mit Argon gespülten Ethanols hinzuge tropft. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung 4 Stunden für **6**, 48 Stunden für **7** und 72 Stunden für **14** unter Rückfluss gerührt. Der beim Abkühlen der Lösung erhaltene Feststoff **6**, **7** und **14** wurde unter Schutzgas abfiltriert, mit Ethanol nachgewaschen und schließlich im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Filtrat wurde noch auf die Hälfte des Volumens eingeeengt und der dabei erhaltene Feststoff wurde ebenfalls mit Ethanol nachgewaschen und getrocknet. Die Ausbeuten lagen bei 30 % für **7**, 36 % für **6** und 42% für **14**.

3.2.3.1 Synthese der Eisen(III)-Komplexe

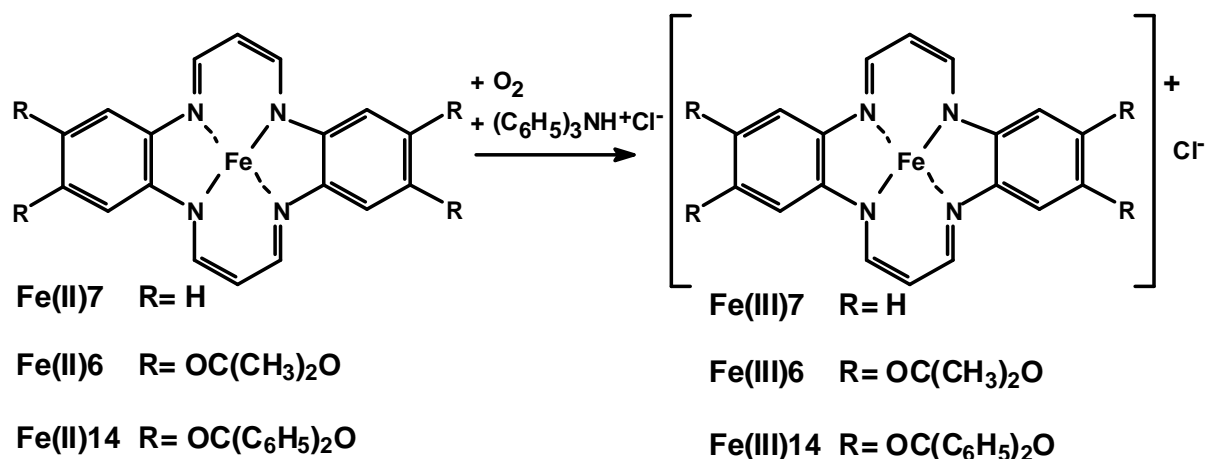
Zur Darstellung der Eisen(III)-tetraaza[14]-annulen-Komplexe **Fe(III)6**, **Fe(III)7** und **Fe(III)14** wurden zunächst die entsprechenden Eisen(II)-Komplexe **Fe(II)6**, **Fe(II)7** und **Fe(II)14** hergestellt. Hierzu wurde unter Schutzgas eine Lösung von Eisen(II)-chlorid, das unter Argon aufbewahrt und eingewogen wurde, in absolutem THF unter Zusatz von Triphenylamin im molaren Verhältnis $\text{FeCl}_2 / \text{Triphenylamin} = 1/3$ angesetzt und über Nacht gerührt. Diese Lösung wurde dann auf 60°C erwärmt und unter Schutzgas eine Lösung des Liganden **6**, **7** bzw. **14** in absolutem THF hinzugegeben. Hierbei wurde ein molares Verhältnis von ca. 1/1 für $\text{FeCl}_2 / \text{Ligand}$ verwendet. Nach beendeter Zugabe wurde noch einige Zeit bei 60°C nachgerührt.



Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurden die Eisen(II)-Komplexe nicht isoliert, sondern die Schutzgasatmosphäre mittels Wasserstrahl-Vakuum abgezogen und durch Öffnen des Hahns Luft in die Apparatur einströmen gelassen. Auf diese Weise wurde die Argon- gegen Luftatmosphäre ausgetauscht und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. So konnte durch Diffusion Sauerstoff in die Reaktionslösung übergehen und hier die vorhandenen Eisen(II)-TAA-Komplexe zu den entsprechenden Eisen(III)-TAA-Komplexen oxidieren. Als Gegenionen standen in der Lösung noch Chlorid-Ionen zur Verfügung, die die 5. Koordinationsstelle besetzen.

Die Eisen(III)-Komplexe **Fe(III)6** und **Fe(III)7** konnten, da sie während der Oxidation als Feststoff ausfielen, unter Schutzgas abfiltriert und durch mehrfaches Nachwaschen mit geringen Mengen an absolutem THF gereinigt werden. Zur

Isolierung von **Fe(III)14** musste die Lösung zunächst durch Abkondensieren des Lösungsmittels auf das halbe Volumen eingengt werden. Der dabei ausgefallene Feststoff wurde dann wie oben beschrieben gereinigt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Ausbeuten lagen bei 92 % für **Fe(III)6**, 72 % für **Fe(III)7** und 18 % für **Fe(III)14**.



Die Eisen(III)-Komplexe wurden per Elementaranalyse (Tab. 6) und ESI-Massenspektrometrie charakterisiert, da eine NMR-Analyse aufgrund des paramagnetischen Eisens nicht möglich war.

Tab. 6: Eisenanalyse der TAA-Komplexe

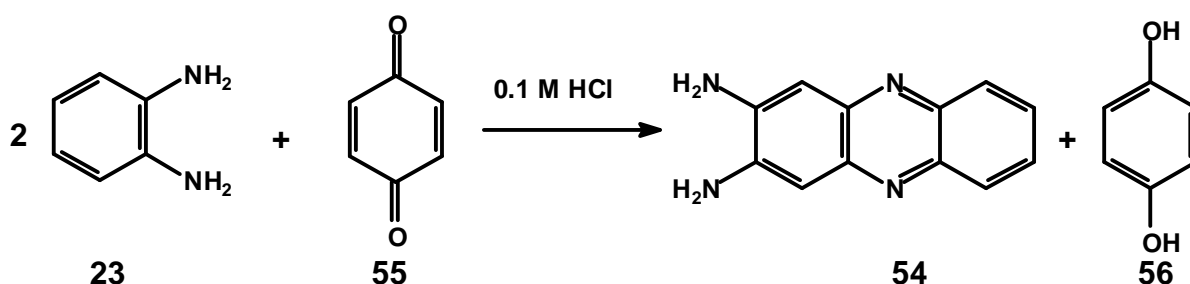
Komplex	Fe(III)7Cl·THF	Fe(III)6Cl	Fe(III)14Cl
% Fe berechnet	12.48 %	10.70 %	7.25 %
%Fe gefunden	12.42 %	10.45 %	6.98 %

3.3 Syntheseversuch weiterer TAA-Liganden

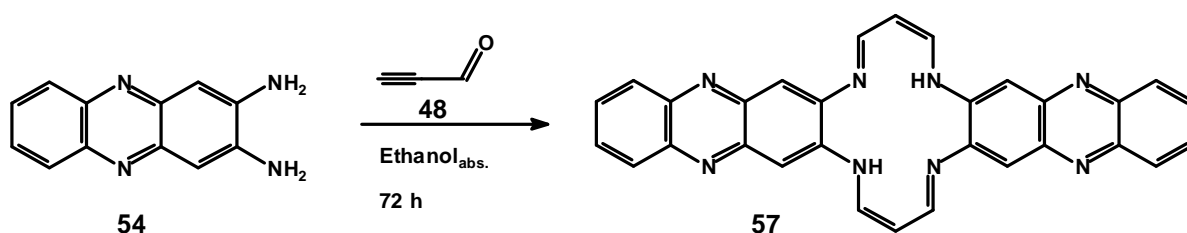
3.3.1 Synthese von 2,3-Phenazindiamin

Als fluorophores System wurde das Phenazin-Gerüst ausgewählt, da dieses in zellulären Messungen bereits Anwendung findet und das entsprechende 2,3-Phenazindiamin **54** ebenfalls zur Durchführung einer Kalibrierung bei den Peroxidase-Messungen verwendet wurde (s. Kapitel 4.2.1).

Die Synthese erfolgte durch Oxidation von 1,2-Phenylendiamin **23** mit 1,4-Benzochinon **55** in 0.10 molarer Salzsäure.^[66, 67] Hierzu wurden 1,4-Benzochinon und 1,2-Phenylendiamin vermischt und mit 0.10 molarer Salzsäure versetzt. Nach 30 minütigem Rühren bei Raumtemperatur fiel das tiefrote Hydrochlorid von **54** aus der Lösung aus. So konnte es scharf abgesaugt, mit Ammoniakwasser in **54** überführt und im Ölpumpenvakuum getrocknet werden. Der Feststoff wurde per Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat/Toluol 9:1 auf Kieselgel $R_f = 0.14$) und ^1H -NMR überprüft. Zur Entfernung von 1,4-Benzochinon **55** und 1,4-Hydrochinon **56** wurde der Feststoff in 5.0 mL 38-40 % NaHSO_3 -Lösung aufgenommen und in 20 % Natronlauge gerührt. Der Feststoff wurde anschließend im Exsikkator über Calciumchlorid getrocknet und per ^1H -NMR und ESI-Massenspektrometrie charakterisiert. Die Ausbeute an 2,3-Phenazindiamin **56** lag hierbei bei 98 %.



3.3.2 Versuch der Zyklisierung mit Propinal und 2,3-Phenazindiamin



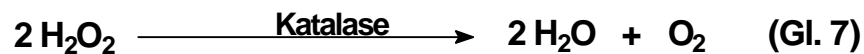
Bei der Umsetzung des **54** mit Propinal **48** wurde analog zu der unter 3.2.3 beschriebenen Zyklisierung vorgegangen. Eine ethanolische Lösung des Diamins **54** wurde unter Schutzgas vorgelegt, auf 40°C erhitzt und bei dieser Temperatur mit einer Lösung von Propinal **48** in absolutem Ethanol versetzt und unter Rückfluss gekocht. Die Reaktion wurde per ESI-Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat:Toluol 9:1 auf Kieselgel) verfolgt. Im ESI – Massenspektrum konnte kein Ligand-Signal gefunden werden. Per Dünnschichtchromatographie konnte jedoch festgestellt werden, dass nach 72 h kein 2,3-Phenazindiamin **54** mehr in der Lösung vorhanden war. Das NMR-Spektrum des ausgefallenen Feststoffes zeigte, dass es sich nicht um den Liganden handeln konnte. Auch durch Einengen der Lösung konnte kein Ligand isoliert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass Nebenreaktionen wie Polykondensationen, die bereits bei der Synthese von anderen TAA - Komplexen von großen Diaminen auftraten^[43], auch hierbei stattfanden und daher eine erfolgreiche Zyklisierung nicht möglich war.

4 Untersuchungen der Komplexe auf enzymatische Aktivität

Die Eisen(III)-Komplexe wurden auf mögliche vorhandene Enzymeigenschaften untersucht.

4.1 Untersuchung auf Katalase - Aktivität

Zunächst wurden Untersuchungen auf eine Katalase - Aktivität angestellt. Hierfür wurde die Disproportionierungsreaktion von H_2O_2 durch die Katalase benutzt.



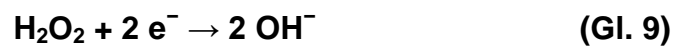
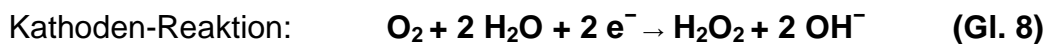
Diese Reaktion wurde mittels einer Clark - Sauerstoffelektrode unter physiologischen Bedingungen (pH 7.2-7.4, 37°C) und unter Laborbedingungen (pH 7.2-7.4, 25°C) untersucht. In beiden Fällen wurde jeweils bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 100 μM auf eine Sauerstoffentwicklung mittels der Clark-Elektrode geachtet. Die gleichen Untersuchungen wurden unter Ersatz der Katalase durch die Eisen(III)-Komplexe wiederholt. Hierfür wurden 2 μL einer 5 mM Stammlösung des Komplexes in Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, so dass in der Elektrode eine Komplex-Konzentration von 10 μM vorlag. Die Methode wird im Folgenden näher beschrieben.

4.1.1 Sauerstoffmessungen mittels Clark Elektrode

Zur Messung der Sauerstoffkonzentration nach Umsetzung von Wasserstoffperoxid wird der Sauerstoff-Partialdruck in wässrigen Lösungen polarographisch mit einer Clark-Elektrode bestimmt.

4.1.1.1 Aufbau und Funktion der Clark-Elektrode

Die gas-sensitive Elektrode besteht aus einer Platin-Kathode (2 mm Durchmesser) und einer ringförmig angeordneten Silber-Anode. Als Elektrolyt dient eine 1.5 M Kaliumchlorid-Lösung, die für den elektrischen Kontakt sorgt. Die Elektrode wird von einer 12 µm-Teflonmembran umschlossen und mit einer konstanten Gleichspannung von 1.5 V polarisiert. Der durch die Membran diffundierende Sauerstoff wird an der Kathodenoberfläche entsprechend einem Vier-Elektronen-Mechanismus reduziert.



Ein mit 1.5 M Kaliumchlorid-Lösung getränktes Papier (Zigarettenpapier) unter der Teflonmembran dient als Elektrolytbrücke und gewährleistet einen geschlossenen Stromkreis. An der Anode wird das Silber oxidiert und Silberchlorid abgeschieden.



Die dadurch erzeugte Spannungsdifferenz steht im direkten stöchiometrischen Verhältnis zur Sauerstoff-Reduktion und wird als Spannungsänderung (ΔU in Abb. 29) mit Hilfe eines Computers mit einer speziellen A/D-Wandlerkarte und der graphischen Messoberfläche DigiS[®] erfasst.

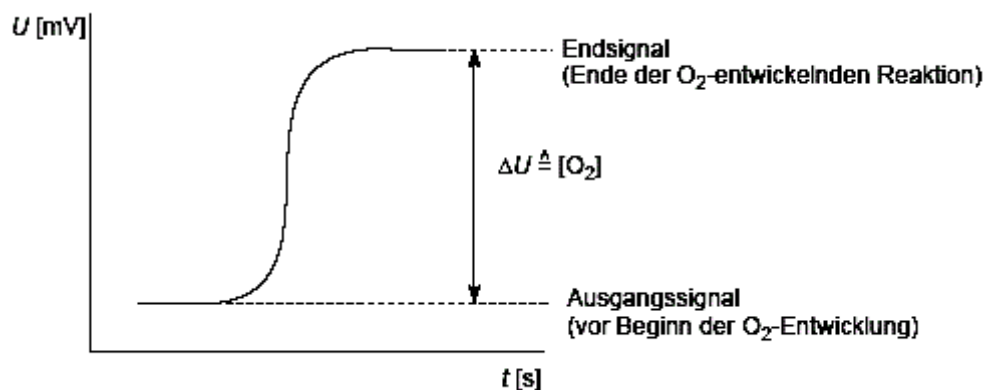


Abb. 29: Detektierbare Zeit-Spannungskurve einer O₂-Clark-Elektrode^[29]

Die freigesetzte Sauerstoffmenge kann durch vorherige Kalibrierung (s. 4.1.1.2) mit Hilfe der Reaktion von Katalase mit bestimmten Mengen H_2O_2 (s. Gl. 7) ermittelt werden.

Ein direkt über der membran-umschlossenen Platin-Kathode befindlicher Magnetrührstab bewirkt die kontinuierliche Durchmischung der Reaktionslösung. Die Reaktionskammer ist mit einem Stempel verschlossen, der das Volumen auf 0.2 mL bis 2.0 mL begrenzt.

4.1.1.2 Kalibrierung der Clark-Elektrode

Da der Sauerstoffpartialdruck der eingesetzten Pufferlösungen abhängig ist vom vorherrschenden Luftdruck und der Umgebungstemperatur, muss die Elektrode täglich neu kalibriert werden.

Die Kalibrierung erfolgt, indem bekannte Konzentrationen an Wasserstoffperoxid in 1.0 mL Phosphatpufferlösung $\text{pH} = 7.2$ mit 2 μL einer 1:100 verdünnten Lösung von natürlicher Katalase (Rinderleberkatalase Suspension, 64000 U/L) in Phosphatpuffer versetzt werden. Die Katalase zersetzt H_2O_2 vollständig zu Wasser und Sauerstoff. Diese Kalibrierungsmessung wird mehrfach wiederholt bis mindestens drei wenig voneinander abweichende Spannungsdifferenzen ΔU erhalten wurden. Aus diesen Werten wird der Mittelwert ΔU_k gebildet. Bildet man nun den Quotienten aus der Spannungsdifferenz ΔU_k und der erwarteten Sauerstoffkonzentration $[\text{O}_2]$ so erhält man einen Kalibrierungsfaktor A ($\text{V}/\mu\text{M}$). Dividiert man die Spannungsdifferenz einer Messung ΔU_{max} durch diesen Faktor A , erhält man die zugehörige Sauerstoffkonzentration $[\text{O}_2]_{\text{max}}$ (Gl. 12).

$$[\text{O}_2]_{\text{max.}} = \frac{\Delta U_{\text{max}}}{A} \quad (\text{Gl. 12})$$

4.1.1.3 Ergebnisse der Sauerstoff-Messungen

Die durch die Katalase aus dem H_2O_2 freigesetzte Menge an Sauerstoff wurde zur Vereinheitlichung der Messergebnisse als 100% Sauerstoffausbeute definiert und die durch die Messungen mittels Komplex-Lösung erhaltene Menge hierauf normiert. Die Sauerstoffausbeute ergibt sich somit aus der maximalen Spannungsdifferenz ΔU_{max} der Messung im Verhältnis zur maximalen Spannungsdifferenz bei der Katalasemessung ΔU_k (Gl. 13). Bedingung hierbei ist, dass in beiden Fällen die Anfangskonzentration an H_2O_2 gleich ist.

$$\% \text{O}_2 = \frac{\Delta U_{\text{max}}}{\Delta U_k} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 13})$$

So werden alle Messergebnisse als % - O_2 dargestellt (Abb. 30).

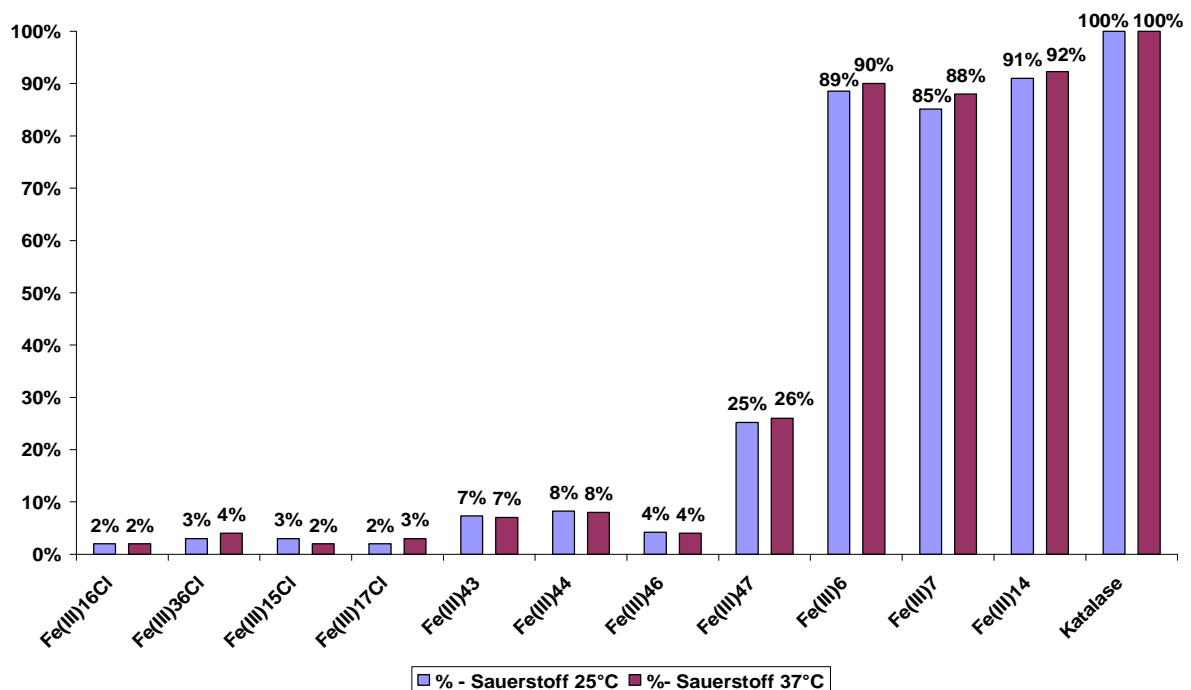


Abb. 30: Sauerstoff-Ausbeute bei Messungen mit 10 μM Komplex und 100 μM H_2O_2 bei 25°C und 37°C bei pH 7.3

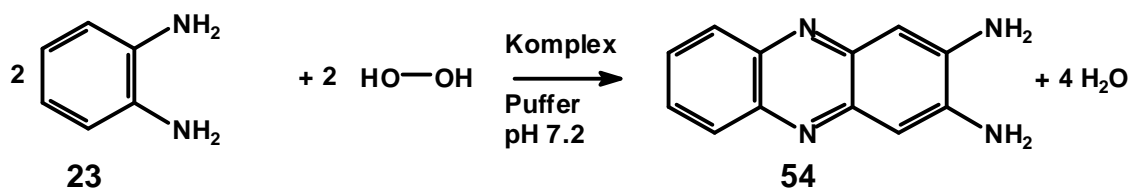
Es zeigte sich bei den Messungen, dass die offenkettigen Eisen(III)-Komplexe **Fe(III)15Cl**, **Fe(III)16Cl**, **Fe(III)17Cl**, **Fe(III)36Cl**, **Fe(III)43**, **Fe(III)44** und **Fe(III)46** nur sehr geringe Ausbeuten an Sauerstoff erbringen. Diese liegen unter dem 1/1 Verhältnis Komplex / Sauerstoff, das bei 10 % erreicht wäre. Daher kann hier nicht von einer katalytischen Aktivität geredet werden, sondern eher von einer Umsetzung zu O₂ im Verhältnis 1/1 mit dem Komplex. Ähnliches gilt für den Komplex **Fe(III)47**. Hier beträgt das Verhältnis O₂ / Komplex = 2.6/1, so dass auch hier eher von einer einfachen Redox - Reaktion gesprochen werden kann als von einer katalytischen oder gar katalasemimetischen Reaktion. Die Eisen(III)-TAA-Komplexe **Fe(III)6**, **Fe(III)7** und **Fe(III)14** hingegen zeigten bereits in früheren Untersuchungen von Baute^[30, 31] katalasemimetische Eigenschaften, die auf diesem Weg bestätigt wurden.

4.2 Untersuchung auf Peroxidase – Aktivität

Die TAA-Eisen(III)-Komplexe **Fe(III)6**, **Fe(III)7** und **Fe(III)14** wurden auf Peroxidase-Aktivität hin überprüft. Hierzu wurden verschiedene durch Peroxidase katalysierte Oxidationsreaktionen untersucht.

4.2.1 Untersuchungen mit 1,2-Phenylendiamin

So wurde die Umsetzung von 1,2-Phenylendiamin **23** mit H_2O_2 zum 2,3-Phenazindiamin **54**, die auch von der Peroxidase katalysiert wird, mittels UV/Vis-Spektroskopie betrachtet.^[68]



Hierzu wurde über eine Gesamtmesszeit von 30 Minuten in jeder Minute einmal das Spektrum von 300 – 700 nm unter physiologischen Bedingungen im Phosphatpuffer bei pH 7.2 und 37°C aufgenommen. Zur Quantifizierung der Menge an entstandenem 2,3-Phenazindiamin **54** wurde eine Kalibrierungsgerade (Abb. 32) mit einer Stammlösung mit bekannter Konzentration von $[\textbf{54}] = 1.00 \text{ g/L}$ erstellt. Hierzu wurden Proben von 2.5 μL , 5.0 μL , 10.0 μL , 20.0 μL , 25.0 μL , 40.0 μL , 50.0 μL und 60.0 μL in je 2.5 mL Puffer verwendet und die Absorption bei der charakteristischen Bande von $\lambda = 417 \text{ nm}$ (Abb. 31) bestimmt.

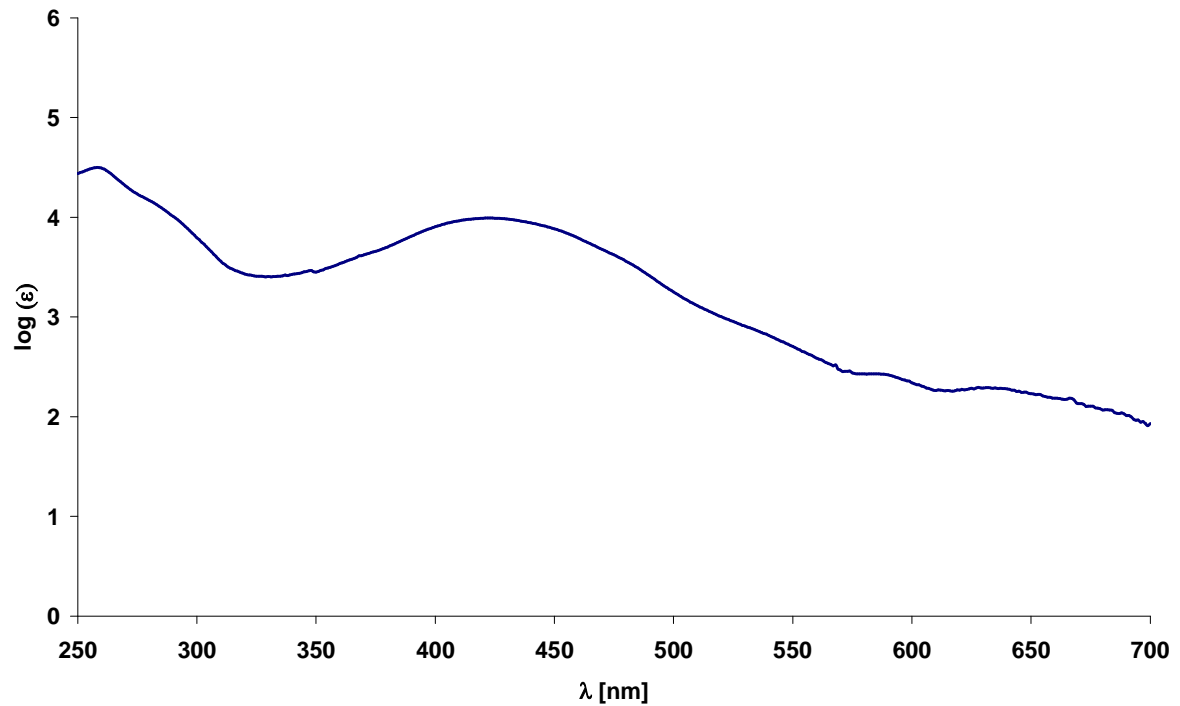


Abb. 31: UV/Vis-Spektrum von 54 in Puffer bei pH 7.2

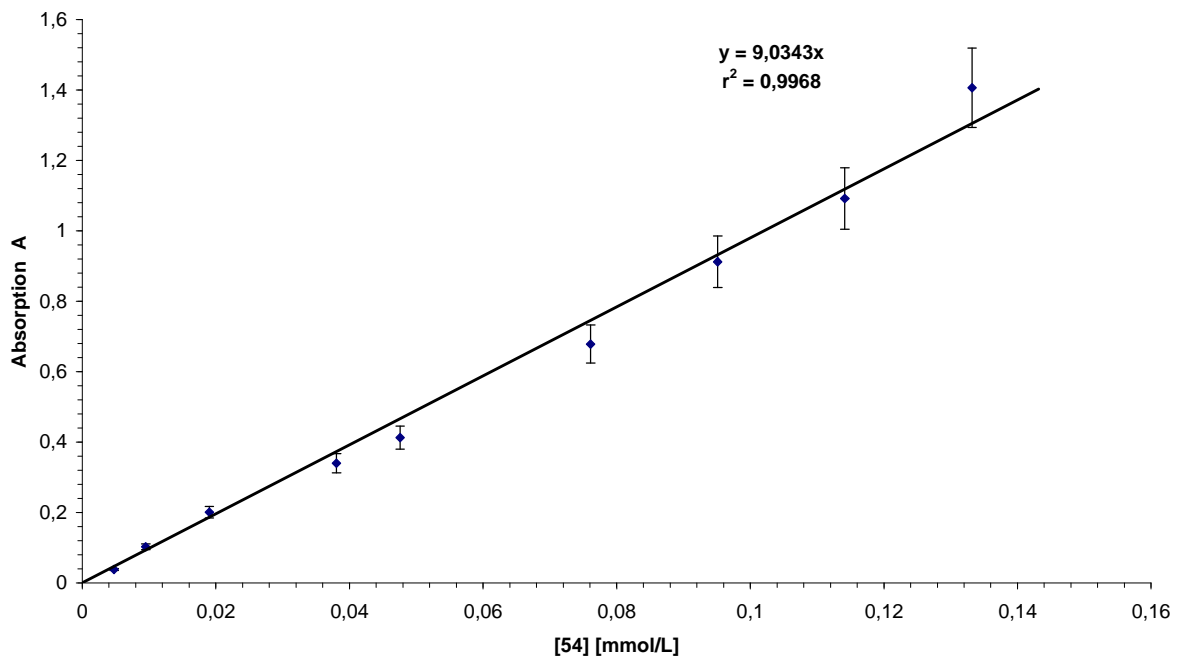


Abb. 32: Kalibrierungsgerade zur Messung mit 2,3-Phenazindiamin 54, gemessen bei 37°C in Puffer bei pH 7.2 und $\lambda = 417$ nm. Aus der Geradengleichung $y = 9.0343 x$ lässt sich hiermit aus der Absorption A die Konzentration an 2,3-Phenazindiamin 54 in den Proben bestimmen.

Anschließend wurden die Messungen mit den Komplexen **Fe(III)6Cl**, **Fe(III)7Cl** und **Fe(III)14Cl** durchgeführt und die entstandene Menge an 2,3-Phenazindiamin **54** über die Gleichung der Kalibrierungsgeraden (Abb. 32) bestimmt. Durch Blindproben zeigte sich, dass in Abwesenheit der oben genannten Komplexe über den gesamten Messzeitraum weder eine Autooxidation des 1,2-Phenylendiamins **23** zum 2,3-Phenazindiamin **54** (Abb. 35) noch eine unkatalysierte Oxidation des 1,2-Phenylendiamins **23** mit Wasserstoffperoxid stattfand (Abb. 36), da das Spektrum über die gesamte Messung identisch blieb. Jedoch wurde bei Anwesenheit des Komplexes **Fe(III)6Cl** (Abb. 37), **Fe(III)7Cl** (Abb. 38) bzw. **Fe(III)14Cl** (Abb. 39) in Gegenwart von Luftsauerstoff sowohl mit (Abb. 37-39 rechts) als auch ohne Wasserstoffperoxidzugabe (Abb. 37-39 links) 2,3-Phenazindiamin **54** gebildet.

Cytochrom P450 besitzt die Fähigkeit elementaren Sauerstoff zu aktivieren und damit Kohlenwasserstoffe zu hydroxylieren. Der Mechanismus der Sauerstoffaktivierung durch Cytochrom P450 ist in Abb. 33 dargestellt.^[4, 69, 70] Zunächst wird das Eisen(III)-zentralatom durch NADPH/H⁺ und Reduktase in einer Ein-Elektronen-Reduktion zu Eisen(II) reduziert. Der Eisen(II)-Komplex kann nun elementaren Sauerstoff binden, wobei Sauerstoff zum Superoxid reduziert und Eisen(II) zu Eisen(III)-oxidiert wird. Durch weitere enzymatische Ein-Elektronen-Reduktion wird das Superoxidradikal-anion zum Peroxyldianion reduziert. Durch Protonierung wird ein Hydroperoxyl-Komplex gebildet (Compound 0). Dieser kann nun auf zwei Weisen protoniert werden. Eine endständige Protonierung führt unter Wasserabspaltung zur Bildung von Compound I, während die Protonierung des zweiten Sauerstoffatoms unter Freisetzung von H₂O₂ zum Eisen(III)-Grundzustand zurückführt. Der Compound I kann ein mögliches Substrat **R-H** zum entsprechenden Alkohol **R-OH** hydroxylieren und so unter Abspaltung des Alkohols zum Eisen(III)-Grundzustand zurückreagieren.

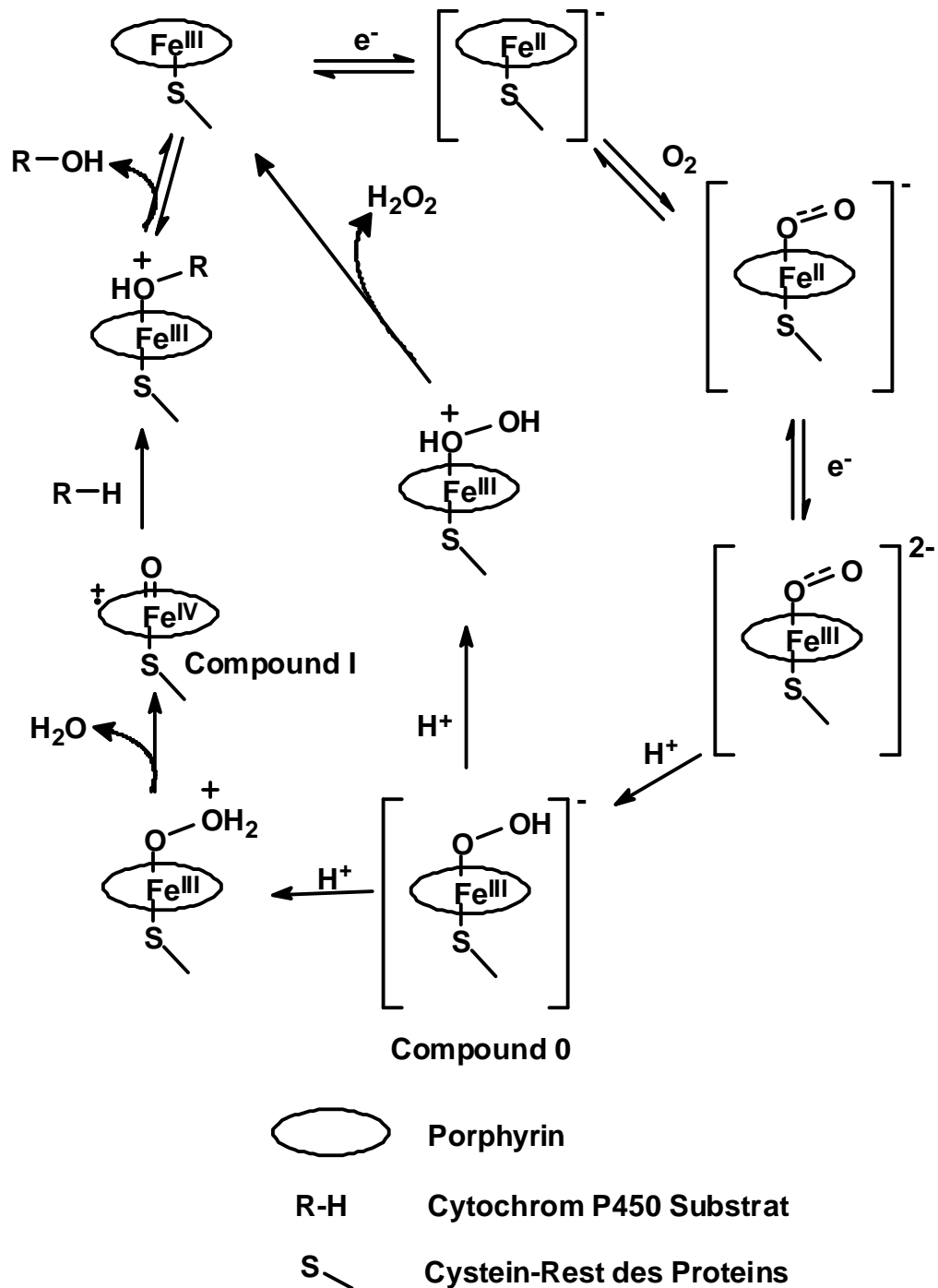
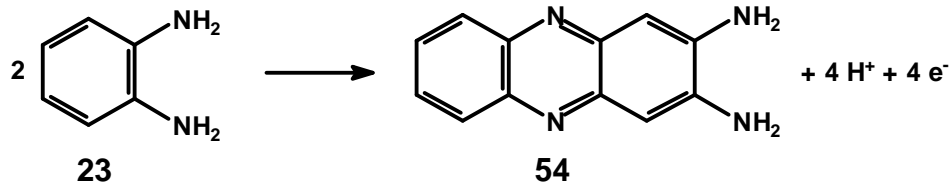


Abb. 33: Mechanismus der Sauerstoffaktivierung und Hydroxylierungsreaktion durch Cytochrom P450^[4, 69, 70]. Die Reduktion erfolgt enzymatisch durch Reduktase unter Oxidation von NADPH/H⁺.^[4]

Da Cytochrom P450 als aktives Zentrum ein Ferriporphyrin enthält und in der Reaktionsfolge Compound I gebildet wird (Abb. 33), könnte dies auch bei den untersuchten Komplexen der Fall sein, da sie sowohl Eigenschaften der Peroxidase als auch der Katalase aufweisen, die beide ebenfalls ein Ferriporphyrin-System als aktives Zentrum besitzen. Geht man von einem der Sauerstoffaktivierung durch das

Cytochrom P-450 ähnlichen Mechanismus (Abb. 34) aus, so müsste zunächst das Zentralatom zum Eisen(II) reduziert werden. Hierbei könnte das Peroxidasesubstrat (z.B. 1,2-Phenylendiamin) als Reduktionsmittel dienen.



Der Eisen(II)-Komplex könnte nun elementaren Sauerstoff binden und zum Superoxid reduzieren. Durch eine zweite Übertragung eines Elektrons vom Substrat auf den Komplex könnte der entsprechende Peroxyl-Komplex gebildet werden.

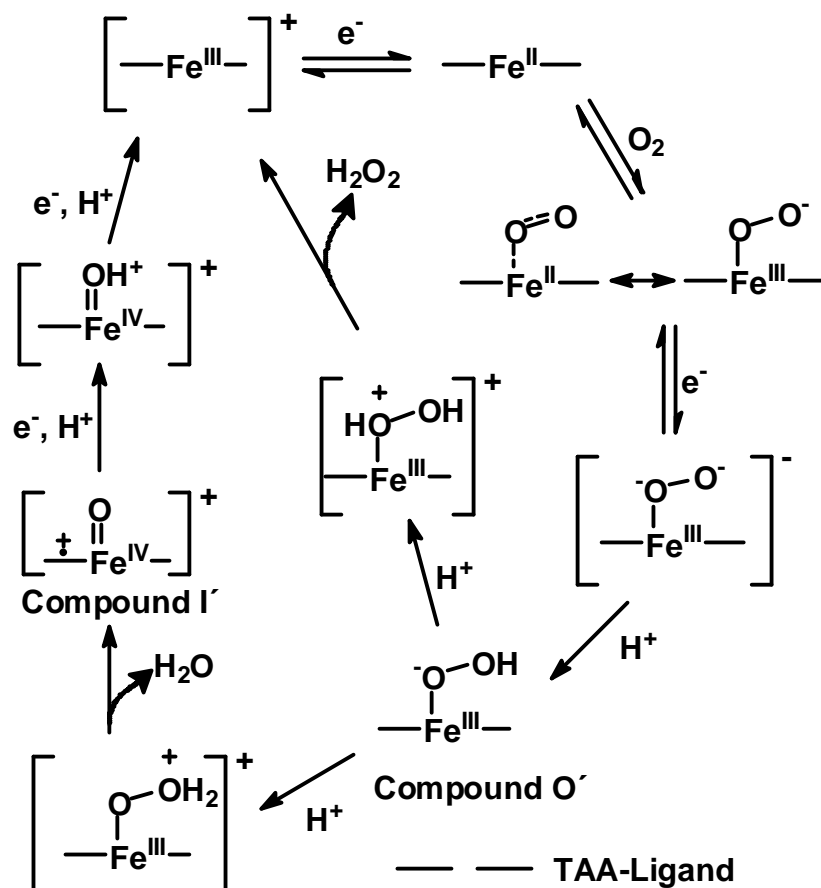


Abb. 34: Möglicher Mechanismus analog der Reaktion von Cytochrom P450 für die Sauerstoffaktivierung durch den Eisen(III)-Komplex und die Bildung von Compound I'. Die Elektronen e^- und Protonen H^+ werden von den Peroxidasesubstraten (1,2-Phenylendiamin, Amplex Red® o.ä.) durch Ein-Elektronen-Oxidation der Substrate geliefert.

Durch Protonierung könnte Compound 0' entstehen, die benötigten Protonen würden ebenfalls durch das Peroxidasesubstrat geliefert. Nach weiterer Protonierung von Compound 0' könnte entweder unter Wasserabspaltung Compound I' entstehen oder unter Abspaltung von H_2O_2 der Eisen(III)-Komplex zurückgebildet werden.

Das freigesetzte H_2O_2 könnte mit dem Eisen(III)-Komplex über die Peroxidasereaktion zu Compound I' (Seite 23 Abb. 11) reagieren. Der Compound I' könnte dann über die Peroxidasereaktion Substrat umsetzen. Somit würde durch 1 mol Sauerstoff doppelt soviel Substrat umgesetzt wie durch 1 mol Wasserstoffperoxid. So könnte der deutliche Anstieg der Absorption bei den Messungen ohne H_2O_2 -Zugabe erklärt werden.

Die Messungen mit Wasserstoffperoxid führten für die Komplexe **Fe(III)6Cl** (Abb. 37 rechts) und **Fe(III)7Cl** (Abb. 38 rechts) zu einer erhöhten Bildung von **54**. Bei **Fe(III)14Cl** (Abb. 39 rechts) führte die Wasserstoffperoxidzugabe zu einer verminderten Bildung von **54**.

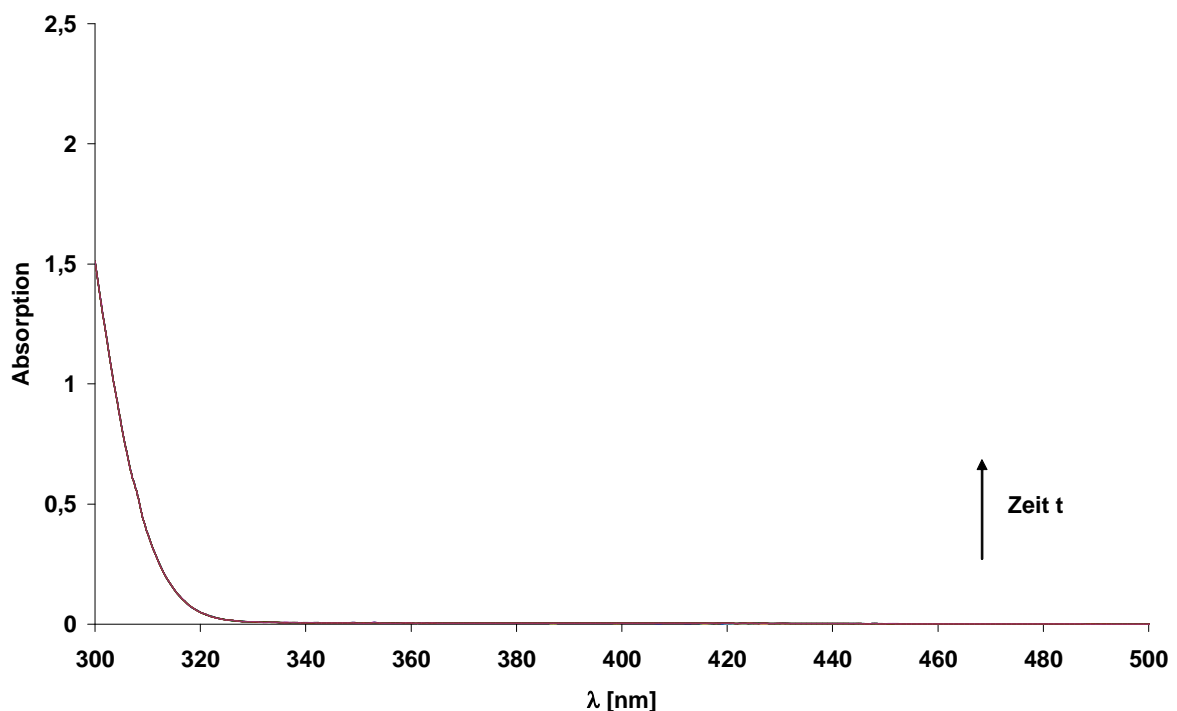


Abb. 35: UV/Vis-Spektren der Bindprobe mit 250 μM 1,2-Phenylendiamin in Puffer bei pH 7.2 und 37°C über 30 min gemessen (1 Scan pro min, keine Reaktion)

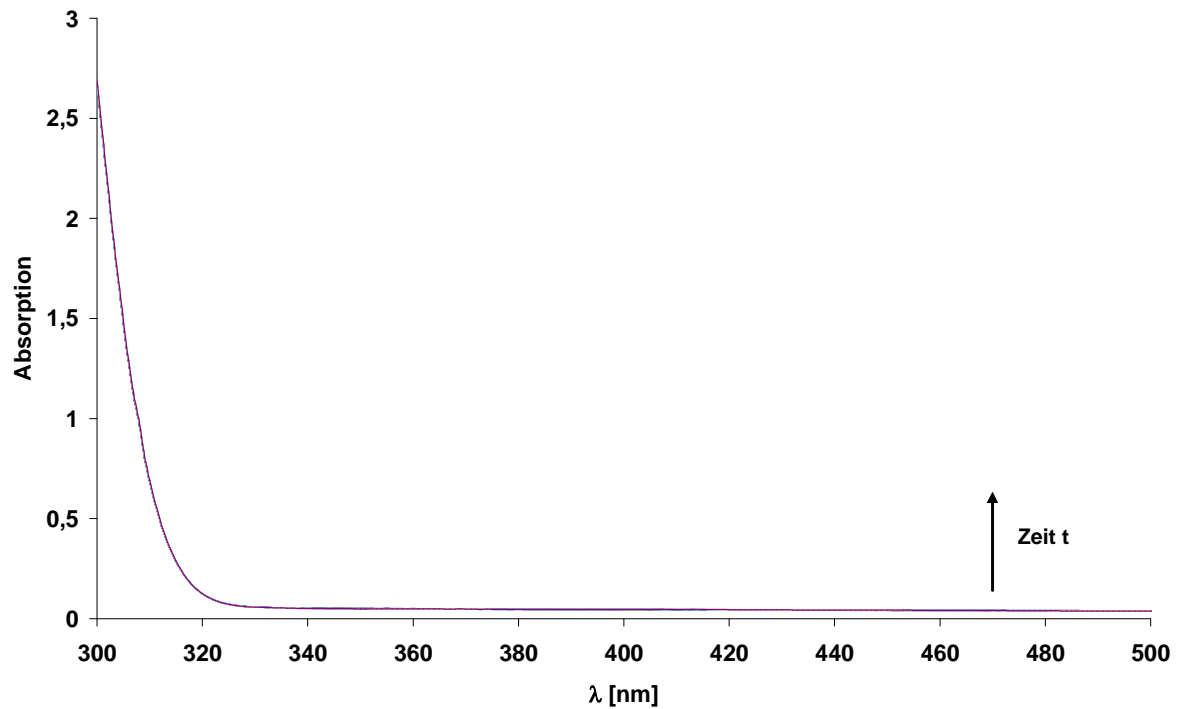


Abb. 36: UV/Vis-Spektren der Blindprobe: 1,2-Phenylendiamin (250 μM) und H_2O_2 (100 μM) in Puffer bei pH 7.2 und 37°C über 30 min gemessen (1 Scan pro min, keine Reaktion)

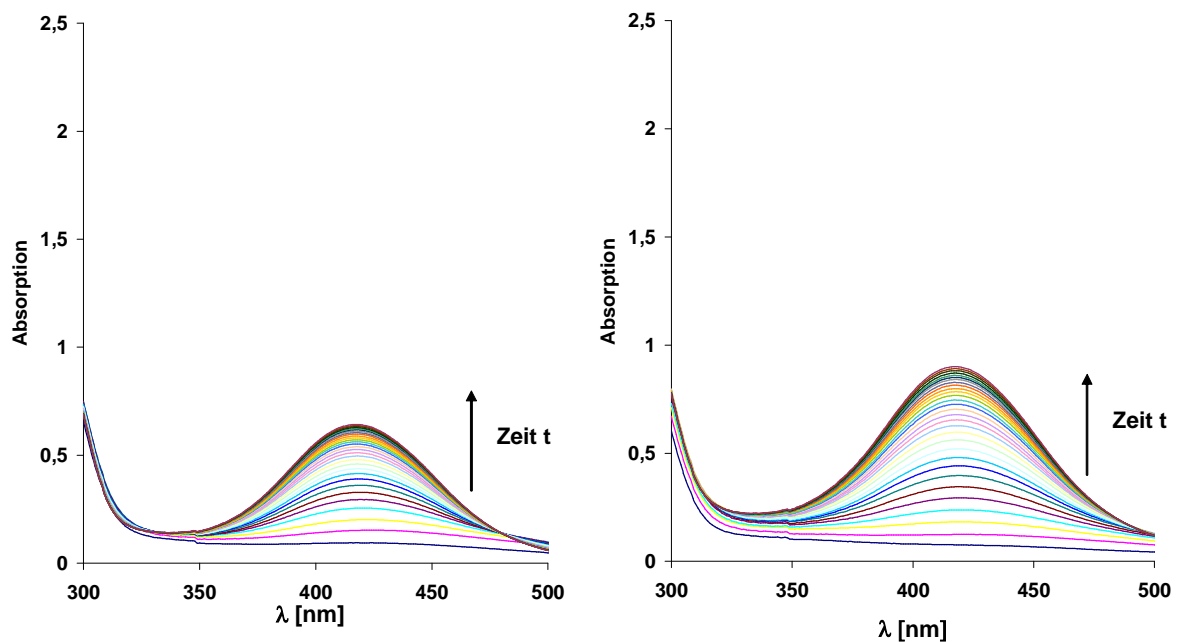


Abb. 37: UV/Vis-Spektren von 1,2-Phenylendiamin (250 μM), $\text{Fe(III)}_6\text{Cl}$ (10 μM) links ohne H_2O_2 , rechts mit H_2O_2 (100 μM) jeweils über 30 min gemessen (1 Scan pro min)

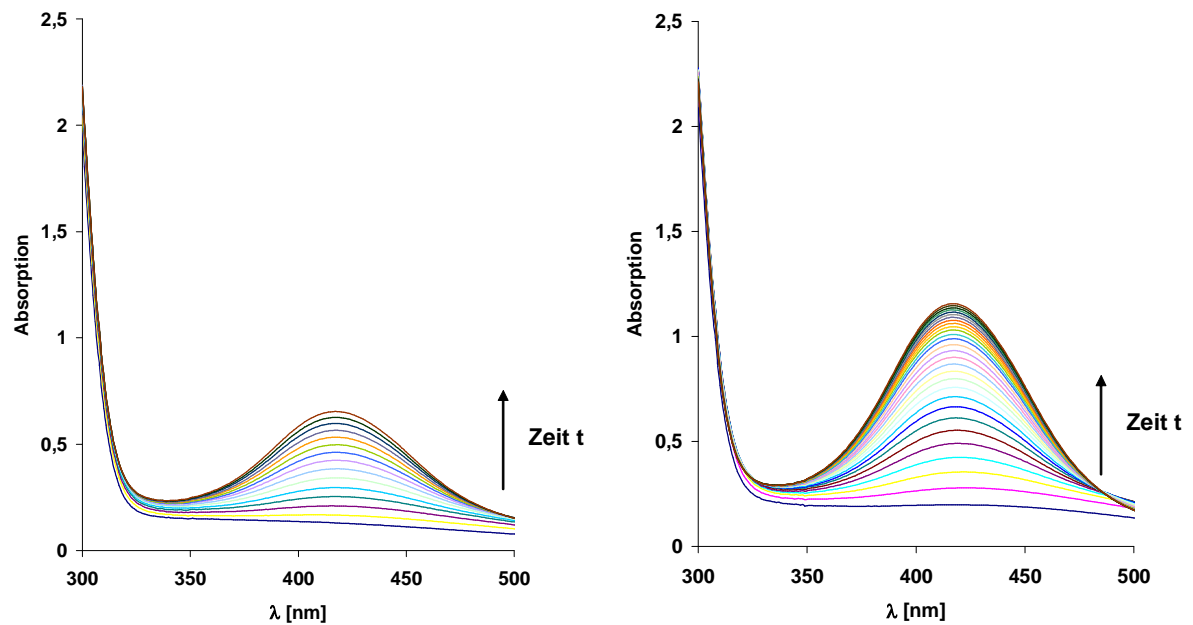


Abb. 38: UV/Vis-Spektren von 1,2-Phenyldiamin (250 μM), Fe(III)7Cl (10 μM) links ohne H₂O₂, rechts mit H₂O₂ (100 μM) jeweils über 30 min gemessen (1 Scan pro min)

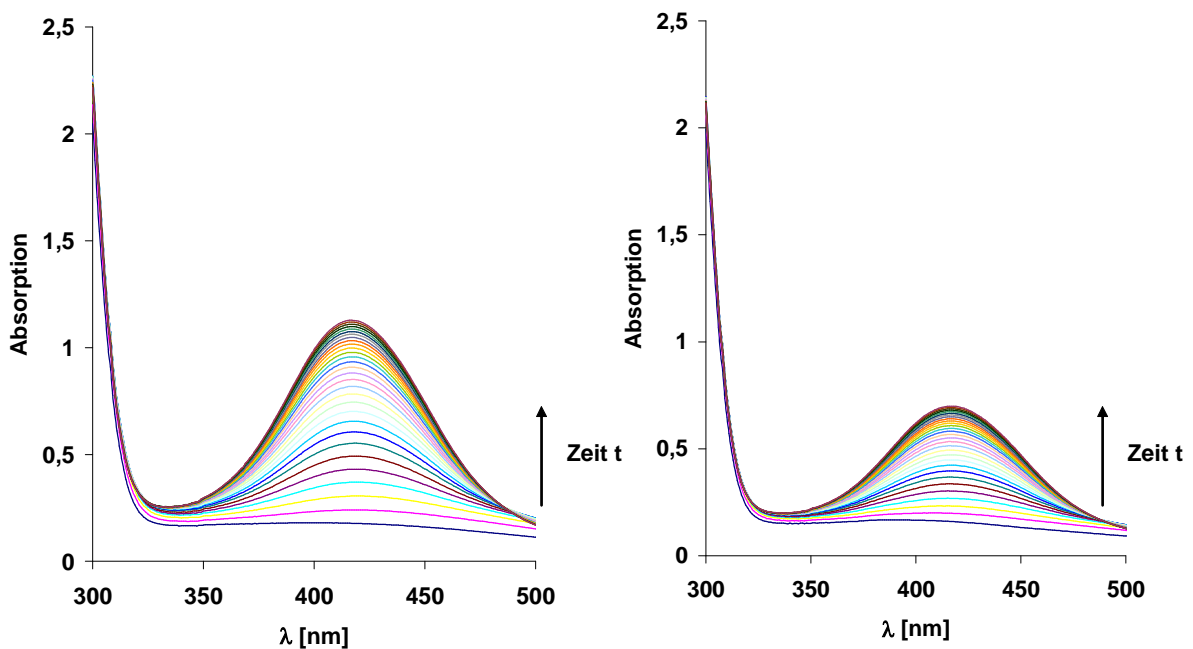


Abb. 39: UV/Vis-Spektren von 1,2-Phenyldiamin (250 μM), Fe(III)14Cl (10 μM) links ohne H₂O₂, rechts mit H₂O₂ (100 μM) jeweils über 30 min gemessen (1 Scan pro min)

Es ist zu erkennen, dass bei den Komplexen **Fe(III)6Cl** (Abb. 37) und **Fe(III)7Cl** (Abb. 38) bei Zugabe von Wasserstoffperoxid mehr 2,3-Phenazindiamin **54** gebildet wird als ohne diese Zugabe, da die Bande bei 417 nm höher ist. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Komplexe als Peroxidasemimetika fungieren und 1,2-Phenylendiamin **23** oxidiert wird. Beim Komplex **Fe(III)14Cl** (Abb. 39) zeigt sich ein anderes Bild. Hier ist die Bande bei Zugabe von Wasserstoffperoxid niedriger als ohne Zugabe. Aus den über die UV/Vis-Spektren erhaltenen Werten bei $\lambda = 417$ nm (Abb. 37-39) kann mittels der Kalibrierungsgeraden (Abb. 32) die jeweils gebildete Menge an 2,3-Phenazindiamin **54** bestimmt werden. Die sich daraus ergebenden Bruttoumsatzkurven mit und ohne H_2O_2 -Zugabe sind in Abb. 40 für **Fe(III)7Cl**, in Abb. 41 für **Fe(III)6Cl** und in Abb. 42 für **Fe(III)14Cl** dargestellt. Zusätzlich wurde die Differenz aus den beiden Messungen mit und ohne H_2O_2 -Zugabe dargestellt, die dem Anteil an 2,3-Phenazindiamin **54** entspricht, der durch das H_2O_2 entsteht. Die aus den Messungen erhaltenen Werte sind in Tab. 7 zusammengefasst.

Tab. 7: Durch die Komplex (10 μM) aus 250 μM 1,2-Phenylendiamin **23** freigesetzte Menge an 2,3-Phenazindiamin **54** unter Zugabe von 100 μM H_2O_2 , ohne Zusatz von H_2O_2 und die Differenz der beiden Werte. Dieser Wert gibt den durch H_2O_2 freigesetzten Anteil an 2,3-Phenazindiamin an.

Komplex	Mit H_2O_2 gebildete Menge an 54 [μM]	Ohne H_2O_2 gebildete Menge an 54 [μM]	Differenz der Messungen
Fe(III)6Cl	108 ± 3	84 ± 3	24 ± 5
Fe(III)7Cl	100 ± 3	50 ± 3	50 ± 3
Fe(III)14Cl	60 ± 2	105 ± 3	-45 ± 3

Es zeigt sich, dass bei der durch **Fe(III)6Cl** 107 μM und **Fe(III)7Cl** 100 μM 2,3-Phenazindiamin **54** bei der Reaktion mit H_2O_2 aus 250 μM 1,2-Phenylendiamin **23** gebildet werden (Abb. 40 bzw. Abb. 41). Während ohne die Zugabe von H_2O_2 durch **Fe(III)6Cl** 84 ± 3 μM und **Fe(III)7Cl** 50 ± 3 μM 2,3-Phenazindiamin **54** freigesetzt werden. Aus der Differenz der Messungen mit und ohne Zusatz von H_2O_2 ergibt sich der Anteil an 2,3-Phenazindiamin **54**, der durch das H_2O_2 gebildet wird. Dieser beträgt bei **Fe(III)7Cl** 50 ± 3 μM , also wurde H_2O_2 bei einer Stöchiometrie von 2:1 vollständig über den Peroxidaseweg umgesetzt, und bei **Fe(III)6Cl** 24 ± 3 μM , was einem 48 ± 6 %igem Umsatz des H_2O_2 über den Peroxidaseweg entspricht.

Bei **Fe(III)14Cl** werden bei Zugabe von H_2O_2 45 μM weniger 2,3-Phenazindiamin **54** gebildet als ohne die Zugabe (Abb. 42).

Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der Komplex **Fe(III)14Cl** aufgrund seiner Phenyl-Substituenten das aktive Zentrum sterisch abschirmt. So könnten sterisch anspruchsvolle Peroxidasesubstrate evtl. nur langsam an das aktive Zentrum gelangen, während Wasserstoffperoxid aufgrund der geringen Größe schneller an das aktive Zentrum gelangt. Somit wird hier die Katalasereaktion bevorzugt und Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser zersetzt. Zusätzlich wird dadurch auch die durch den Komplex katalysierte Autooxidation des Substrates durch Sauerstoff teilweise inhibiert, da Wasserstoffperoxid umgesetzt und so das aktive Zentrum blockiert wird. Dies könnte dazu führen, dass bei gleicher Messzeit 45 μM weniger 2,3-Phenazindiamin **54** über die Sauerstoffaktivierung gebildet wird.

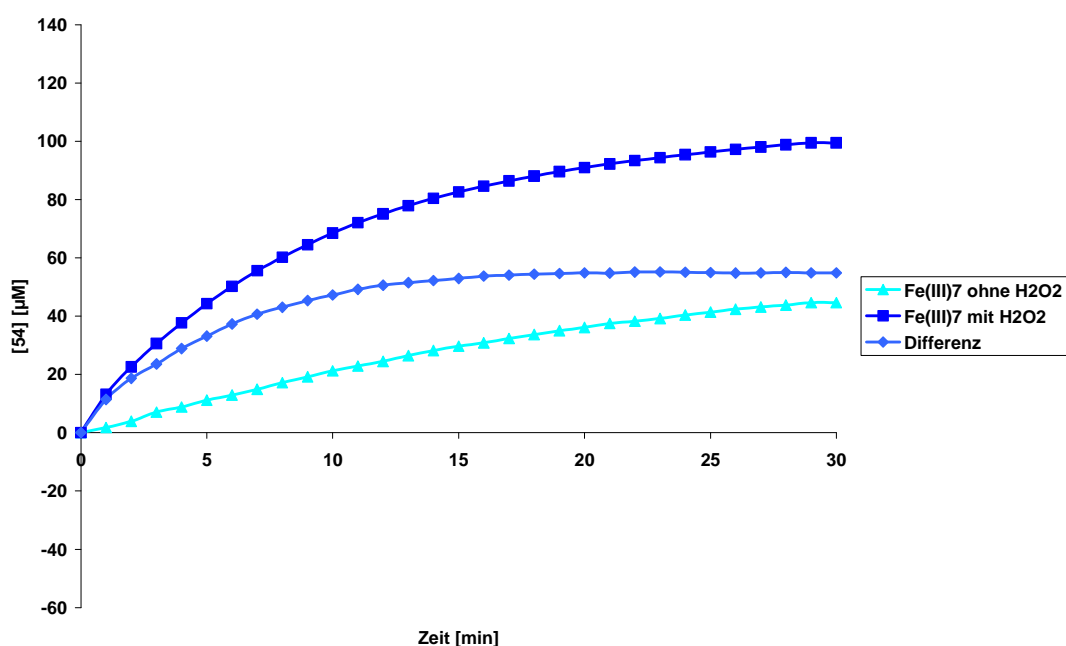


Abb. 40: UV/Vis- Bruttoumsatzkurven ($n=4$) der Reaktion von 1,2-Phenylendiamin **23** (250 μM), **Fe(III)7Cl** (10 μM), ohne H_2O_2 und mit H_2O_2 (100 μM) bei 37°C und $\lambda=417\text{ nm}$. Aufgetragen ist die Konzentration an gebildetem 2,3-Phenazindiamin **54** gegen die Zeit. Die dritte Kurve entspricht der nur durch die Reaktion von 1,2-Phenylendiamin **23** mit H_2O_2 freigesetzten Menge an 2,3-Phenazindiamin **54**.

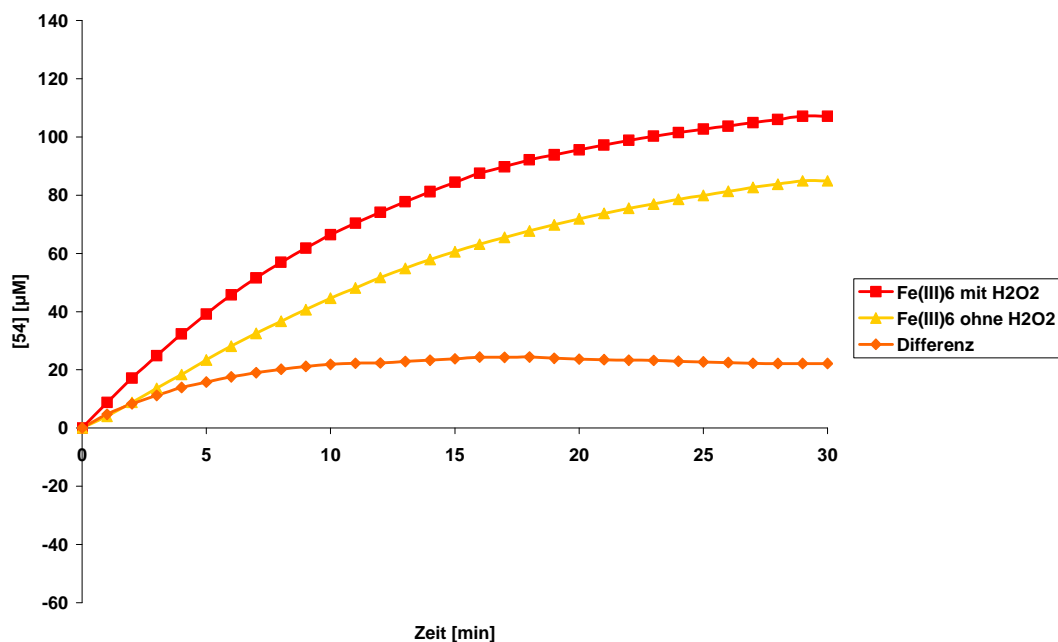


Abb. 41: UV/Vis- Bruttoumsatzkurven (n=4) der Reaktion von 1,2-Phenylendiamin 23 (250 µM), Fe(III)6Cl (10 µM), ohne H₂O₂ und mit H₂O₂ (100µM) bei 37°C und $\lambda = 417$ nm. Aufgetragen ist die Konzentration an gebildetem 2,3-Phenazindiamin 54 gegen die Zeit. Die dritte Kurve entspricht der nur durch die Reaktion von 1,2-Phenylendiamin 23 mit H₂O₂ freigesetzten Menge an 2,3-Phenazindiamin 54.

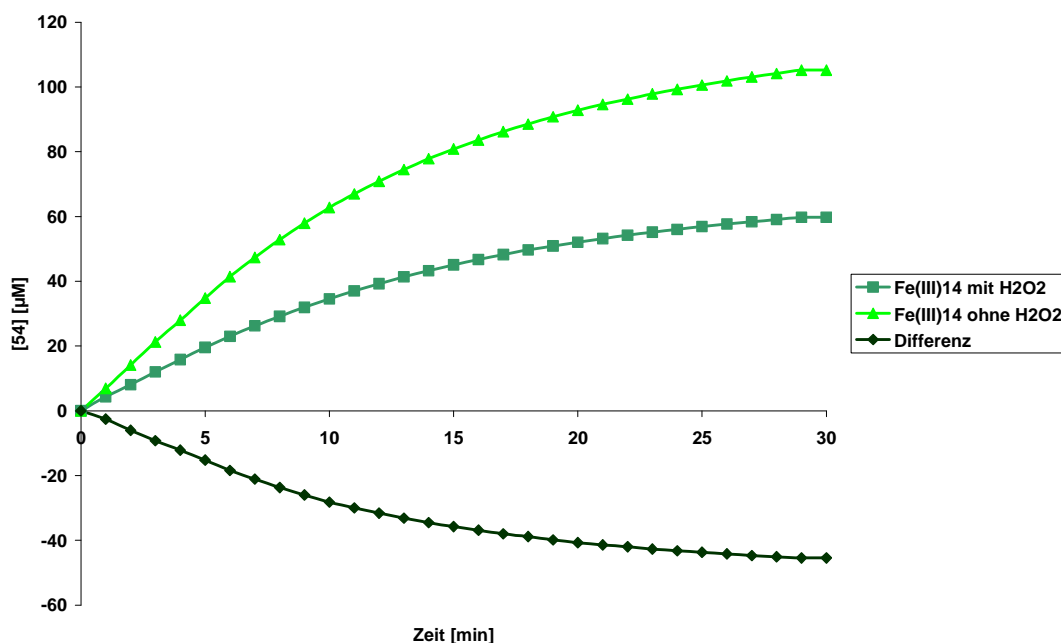
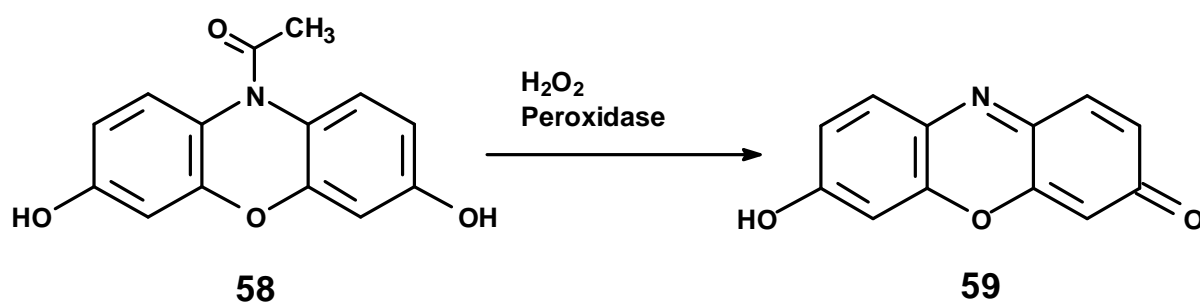


Abb. 42: UV/Vis-Bruttoumsatzkurven (n=4) der Reaktion von 1,2-Phenylendiamin 23 (250 µM), Fe(III)14Cl (10 µM), ohne H₂O₂ und mit H₂O₂ (100µM) bei 37°C und $\lambda = 417$ nm. Aufgetragen ist die Konzentration an gebildetem 2,3-Phenazindiamin 54 gegen die Zeit. Die dritte Kurve entspricht der nur durch die Reaktion des Komplexes mit H₂O₂ nicht freigesetzten Menge an 2,3-Phenazindiamin 54.

Die durch den Komplex katalysierte Autooxidation des 1,2-Phenylendiamins **23** läuft jedoch beim Komplex **Fe(III)14Cl** trotz sterischer Hinderung am schnellsten von allen drei Komplexen ab, so dass bereits nach 30 min 105 μM 2,3-Phenazindiamin **54** über diesen Weg gebildet werden. Dies ließe sich damit erklären, dass die gebildete reaktive Zwischenstufe aus Sauerstoff und Komplex bei **Fe(III)14Cl** schneller gebildet wird oder wesentlich reaktiver ist. Somit würde in kürzerer Zeit auch mehr 1,2-Phenylendiamin **23** zum 2,3-Phenazindiamin **54** reagieren. Jedoch ist die Herleitung eine Struktur-Wirkungs-Beziehung anhand von drei verschiedenen Komplexen nur sehr schwer möglich.

4.2.2 Untersuchungen mit Amplex Red[®][71]

Die Umsetzung von Amplex Red[®] **58** (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) zum fluoreszierenden Resorufin **59** (Exc. λ = 571 nm Em. λ = 586 nm) wurde als literaturbekannter^[71] Nachweis von Peroxidaseaktivität verwendet. Hierbei wurden an Stelle der fluoreszenzspektroskopischen Messungen UV/Vis-spektroskopische Messungen durchgeführt, da hier mit wesentlich höheren Konzentrationen an Wasserstoffperoxid und Amplex Red[®] **58** gearbeitet werden kann, ohne dass Fehler durch Fluoreszenzsättigung oder Löschung auftreten.^[72]



Die UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen wurden in 50 mM Phosphat-Puffer bei pH 7.2 und 37°C durchgeführt. Hierzu wurde die für das Resorufin **59** charakteristische Bande bei λ = 570 nm betrachtet und Messungen über einen Zeitraum von 30-40 Minuten durchgeführt. Die Anfangskonzentration an H₂O₂ von 20 μ M und Komplex von 10 μ M wurden hierbei stets beibehalten, während die Konzentration an Amplex Red[®] **58** variiert wurde (10 μ M, 20 μ M bzw. 50 μ M). Als Blindprobe wurde jeweils derselbe Ansatz ohne Zugabe von H₂O₂ angesetzt. Bei diesen Blindproben zeigte sich ebenfalls die Bildung von Resorufin **59**. Dies könnte für eine Sauerstoffaktivierung durch den Komplex sprechen, wie sie bereits unter 4.2.1 beschrieben wurde.

Mess- und Blindwerte der einzelnen Messungen sind in Abb. 42, Abb. 44 und Abb. 45 dargestellt. Nach einer zweiminütigen Vorlaufzeit wurde der Komplex zugegeben, nach weiteren 3 Minuten wurde das Wasserstoffperoxid zugesetzt.

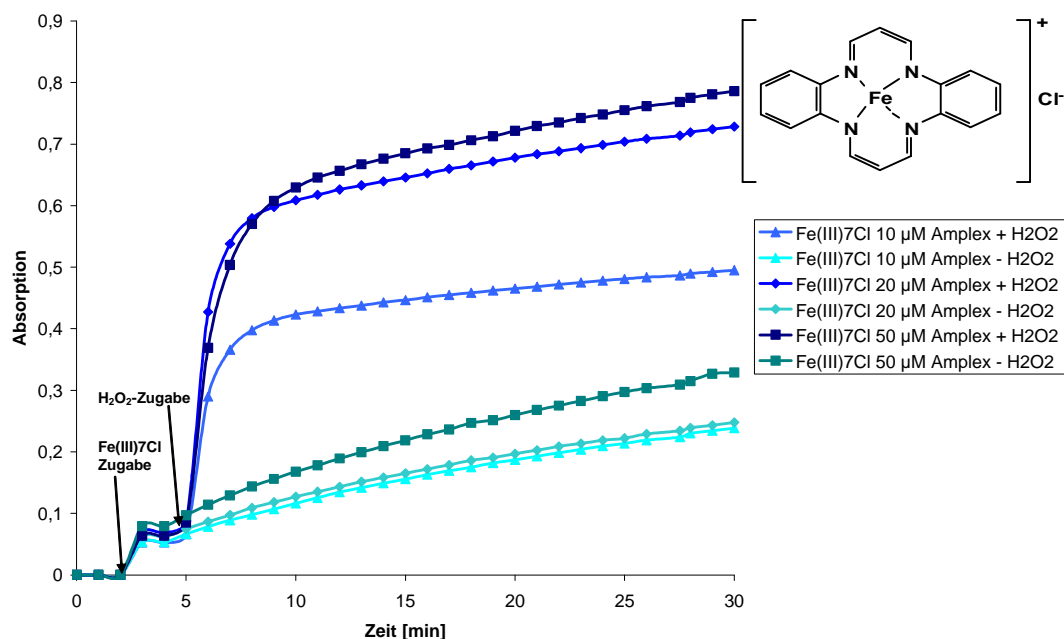


Abb. 43: UV/Vis -Messungen bei $\lambda = 570$ nm mit dem Komplex Fe(III)7Cl in Puffer bei pH 7.2. Amplex Red[®] wurde in Konzentration von 10, 20 bzw. 50 μ M in Puffer vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 10 μ M Fe(III)7Cl, nach 5 min die Zugabe von 20 μ M H₂O₂.

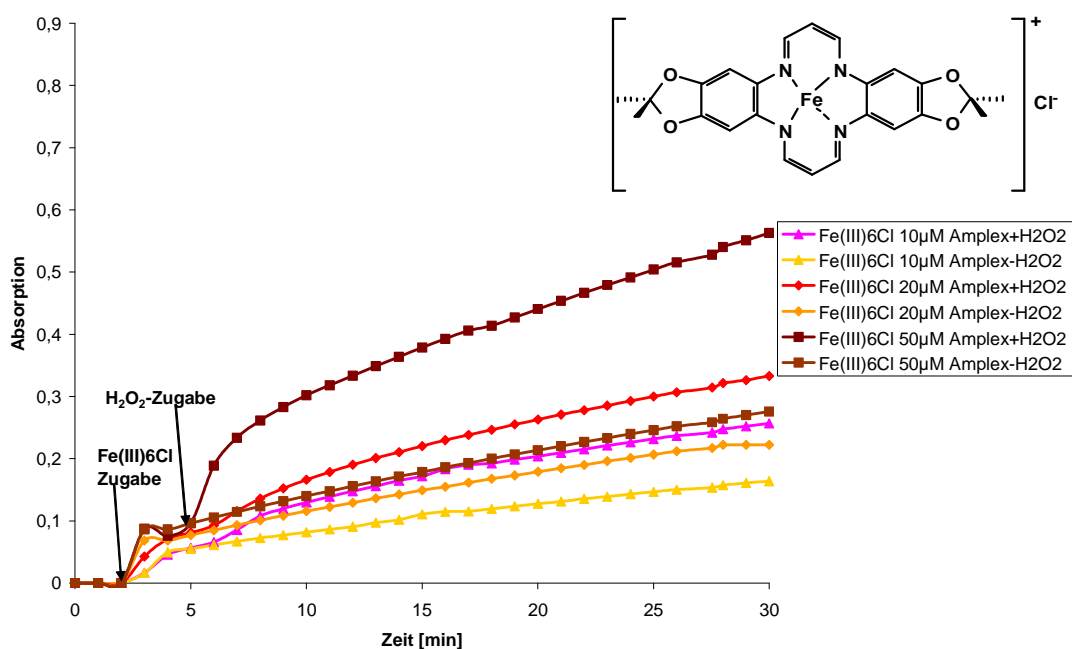


Abb. 44: UV/Vis -Messungen bei $\lambda = 570$ nm mit dem Komplex Fe(III)6Cl in Puffer bei pH 7.2. Amplex Red[®] wurde in Konzentration von 10, 20 bzw. 50 μ M in Puffer vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 10 μ M Fe(III)6Cl, nach 5 min die Zugabe von 20 μ M H₂O₂.

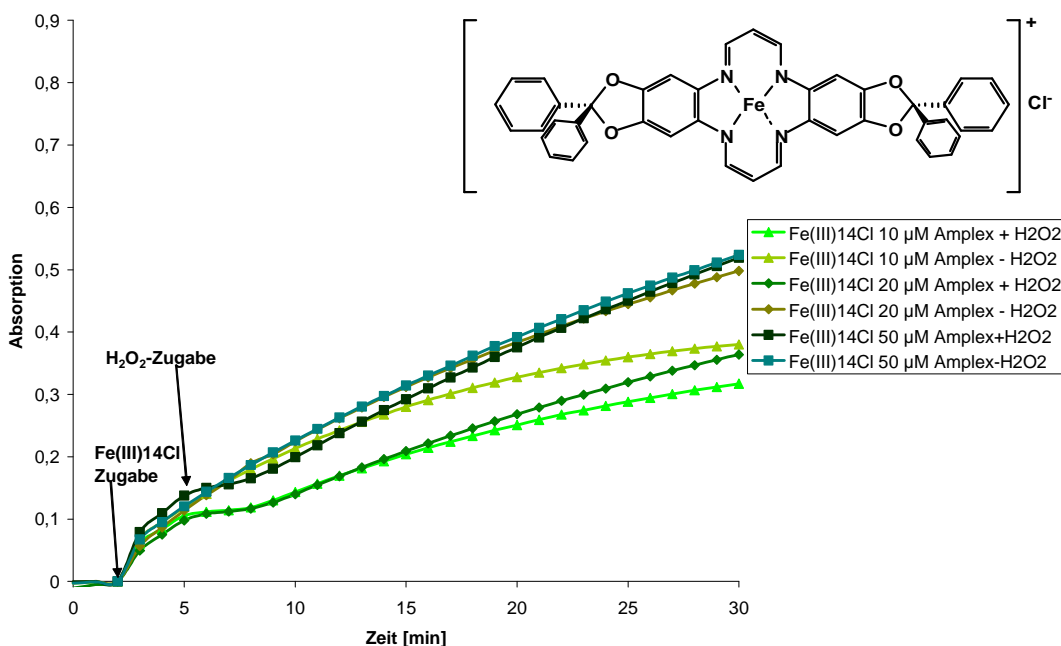


Abb. 45: UV/Vis -Messungen bei $\lambda = 570$ nm mit dem Komplex **Fe(III)14Cl** in Puffer bei pH 7.2. Amplex Red[®] wurde in Konzentration von 10, 20 bzw. 50 μM in Puffer vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 10 μM **Fe(III)14Cl**, nach 5 min die Zugabe von 20 μM H_2O_2 .

Die UV/Vis-Messungen zeigen bereits nach Zugabe des jeweiligen Komplexes einen deutlichen Anstieg der Absorption bei $\lambda = 570$ nm. Dieser Anstieg setzt sich in den Kurven ohne H_2O_2 -Zusatz weiter fort und ist auf die Aktivierung des gelösten Sauerstoffs zurückzuführen, wie sie bereits unter 4.2.1 beschrieben wurde. Bei den Komplexen **Fe(III)6Cl** (Abb. 44) und **Fe(III)7Cl** (Abb. 43) kommt es bei der Zugabe von H_2O_2 zu einem stärkeren Anstieg der Absorption, da nun H_2O_2 über den Peroxidaseweg umgesetzt und Amplex Red[®] **58** zu Resorufin **59** oxidiert wird.

Die Kurven für den Komplex **Fe(III)14Cl** (Abb. 45) zeigen bei Wasserstoffperoxid-Zugabe eine geringere Steigung als die Kurven ohne Wasserstoffperoxid. Dies lässt sich wie folgt erklären:

Bei Zugabe von Wasserstoffperoxid setzt beim Komplex **Fe(III)14Cl** zunächst die Katalasereaktion ein, die auf Grund der erhöhten sterischen Hinderung durch die Phenyl-Substituenten wesentlich schneller als die Peroxidase-Reaktion verläuft. Deutlich wird dies daran, dass bei Zugabe von Wasserstoffperoxid die Kurven zunächst abflachen (Abb. 45 im Bereich von 5-7 Minuten Messzeit), da H_2O_2 und nicht Amplex Red[®] **58** als Substrat umgesetzt wird (Abb. 45). Nach beendeter Katalase-Reaktion setzt die Sauerstoffaktivierung wieder ein und Amplex Red[®] **58**

wird sauerstoffabhängig zu Resorufin **59** umgesetzt. Dies zeigt sich darin, dass die jeweiligen Kurven mit und ohne H_2O_2 -Zugabe anschließend parallel zueinander verlaufen (Abb. 45 ab 8 Minuten Messzeit). Jedoch ist auch in diesem Fall bei **Fe(III)14Cl** die sauerstoffabhängige Autooxidation in Anwesenheit der Komplexe am größten. Dies spricht wiederum für eine hohe Reaktivität der gebildeten Zwischenstufe des Komplexes trotz der erhöhten sterischen Abschirmung des aktiven Zentrums.

Zur Auswertung der Messungen wird der Anteil an H_2O_2 bestimmt, der über den peroxidasemimetischen Weg der Eisenkomplexe abgebaut wurde. Hierzu wurde die Differenz der Absorption zwischen der Messung mit und ohne H_2O_2 ΔA_k bestimmt. Die Differenzen bei den verschiedenen Amplex Red Konzentrationen sind für **Fe(III)7Cl** in Abb. 46, für **Fe(III)6Cl** in Abb. 47 und **Fe(III)14Cl** in Abb. 48 dargestellt.

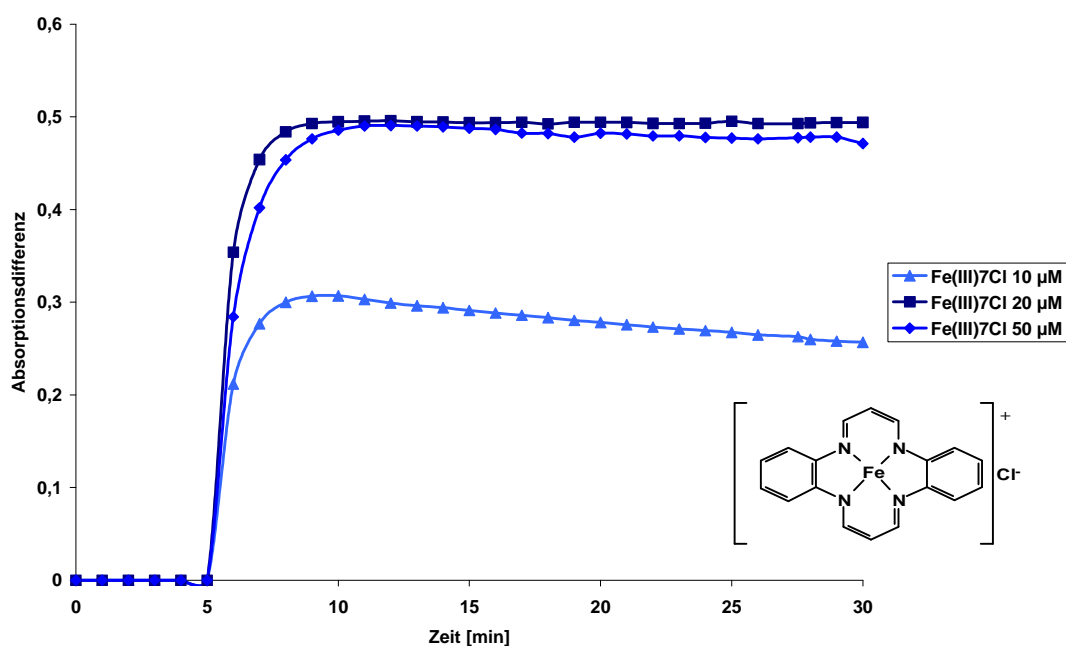


Abb. 46: Differenzen der in Abb. 43 dargestellten UV/Vis -Messungen bei $\lambda = 570$ nm mit dem Komplex **Fe(III)7Cl** in Puffer bei pH 7.2. Amplex Red[®] wurde in Konzentration von 10, 20 bzw. 50 μM in Puffer vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 10 μM **Fe(III)7Cl**, nach 5 min die Zugabe von 20 μM H_2O_2 .

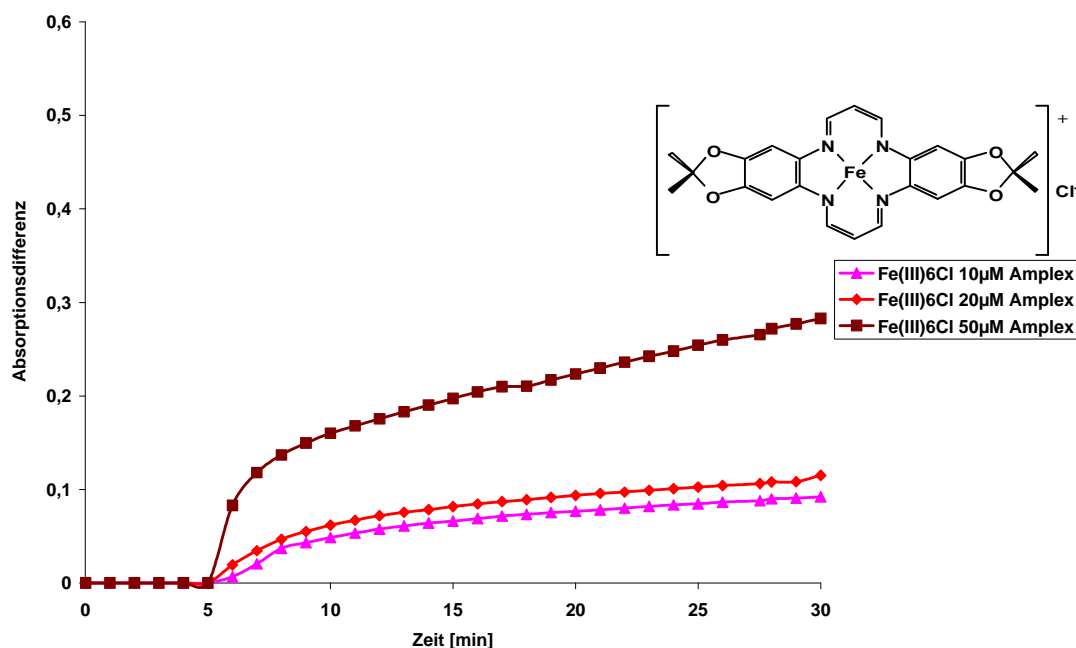


Abb. 47: Differenzen der in Abb. 44 dargestellten UV/Vis -Messungen bei $\lambda = 570$ nm mit dem Komplex Fe(III)6Cl in Puffer bei pH 7.2. Amplex Red[®] wurde in Konzentration von 10, 20 bzw. 50 μ M in Puffer vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 10 μ M Fe(III)7Cl, nach 5 min die Zugabe von 20 μ M H₂O₂.

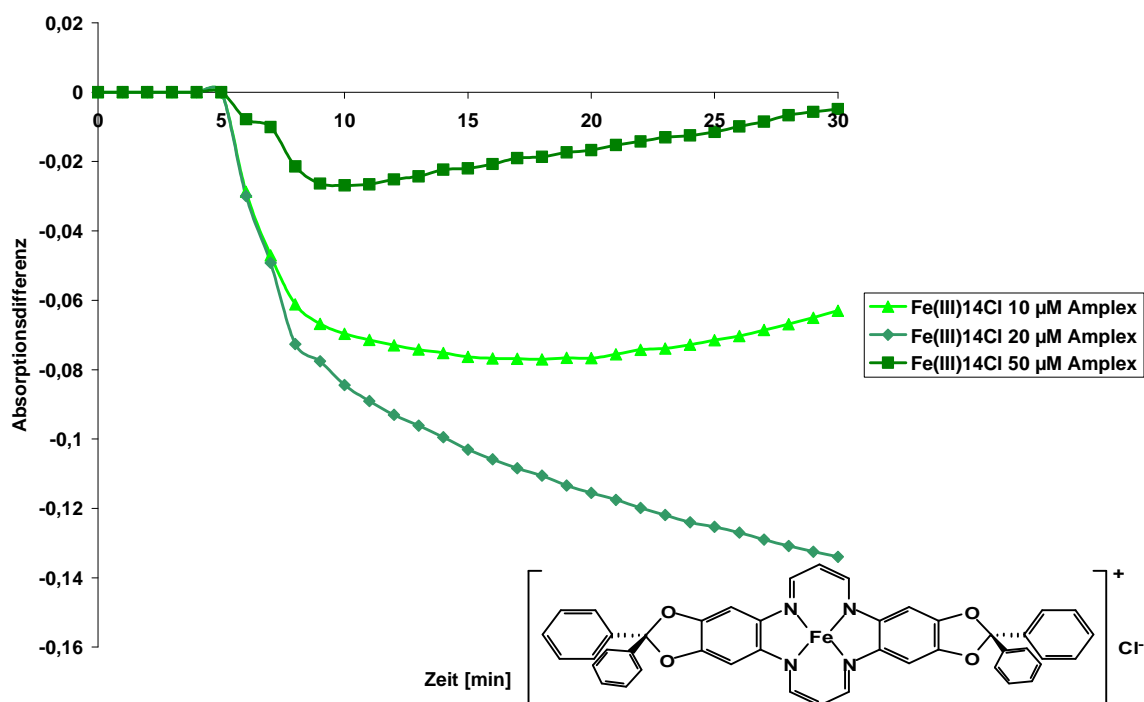


Abb. 48: Differenzen der in Abb. 45 dargestellten UV/Vis -Messungen bei $\lambda = 570$ nm mit dem Komplex Fe(III)14Cl in Puffer bei pH 7.2. Amplex Red[®] wurde in Konzentration von 10, 20 bzw. 50 μ M in Puffer vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 10 μ M Fe(III)7Cl, nach 5 min die Zugabe von 20 μ M H₂O₂.

Zum relativen Vergleich der Eisen-Komplexe mit einer nativen Meerrettichperoxidase (POD) von Roche werden von dieser käuflichen Stammlösung (3800000 U/L) 2 μ L an Stelle eines Eisen-Komplexes in einer Amplex[®]-Red – Pufferlösung in die Küvette gegeben. Die Messprozedur ist identisch zur Messung der Eisen-Komplexe.

Der über den peroxidasemimetischen Weg verbrauchte Anteil an H₂O₂ bestimmt sich dann nach Gl. 14.

$$PA[\%] = \frac{\Delta A_k}{\Delta A_p} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 14})$$

PA: peroxidasemimetischer Anteil

ΔA_p : maximaler Messwert für native Peroxidase

ΔA_k : maximaler Messwert für den Eisenkomplex

Die über den peroxidasemimetischen Weg verbrauchten Anteile an H₂O₂ sind in Abb. 49 dargestellt.

Es zeigte sich, dass der Komplex **Fe(III)7Cl** von den drei Komplexen die höchste und der Komplex **Fe(III)14Cl** keine peroxidasemimetische Aktivität aufweist.

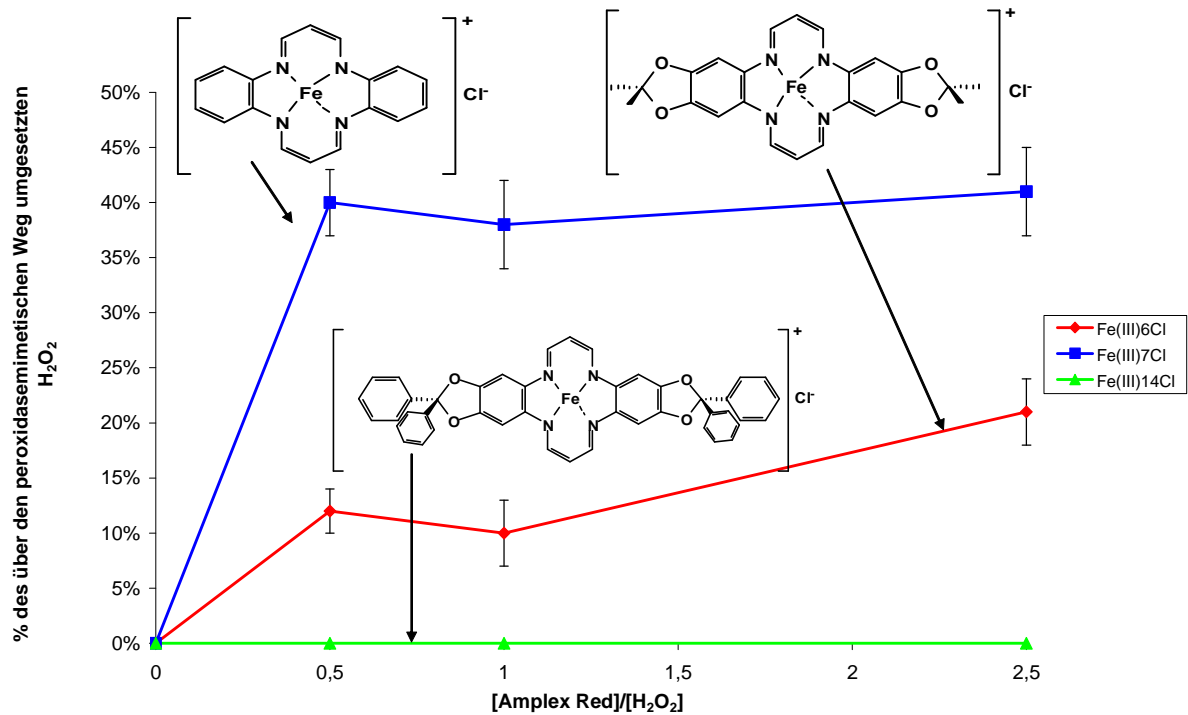


Abb. 49: Peroxidasemimetischer Anteil in % verbrauchten H₂O₂ in Abhängigkeit vom Verhältnis [Amplex Red®] zu [H₂O₂] bei einer Komplex-Konzentration von 10 µM und einer Anfangskonzentration an H₂O₂ von 20 µM. Bestimmt durch UV/Vis-Messungen bei 570 nm.

Um die Konkurrenz zwischen Katalase- und Peroxidasereaktion genauer zu betrachten, wurden noch Messreihen durchgeführt, in denen bei Sauerstoffmessungen mit allen drei Komplexen jeweils verschiedene Mengen an Amplex Red® **58** hinzugefügt wurden und der Effekt auf die Messergebnisse beobachtet wurde (Abb. 50).

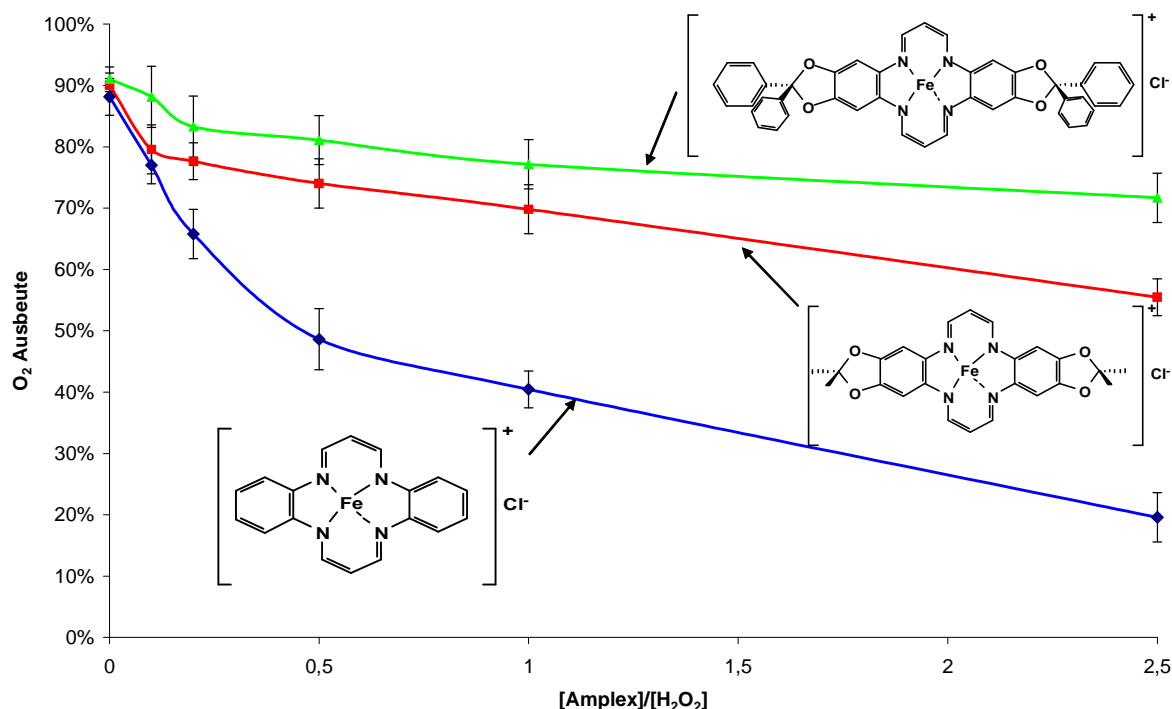


Abb. 50: Sauerstoffausbeuten über den katalasemimetischen Weg in Abhängigkeit vom Verhältnis von [Amplex Red[®]] zu [H₂O₂] bei einer Komplex-Konzentration von 50 µM und einer Anfangskonzentration an H₂O₂ von 100 µM.

Zunächst einmal fällt auf, dass alle Komplexe unter den gewählten Versuchsbedingungen sowohl H₂O₂ über die Katalasereaktion zu Wasser und Sauerstoff als auch Amplex Red[®] **58** zu Resorufin **59**, das an der starken Magenta-Farbe erkennbar ist, umsetzten. Außerdem sinkt die Sauerstoffausbeute bei Zugabe von Amplex Red[®] **58** erwartungsgemäß ab, da ein Teil des H₂O₂ über den Peroxidaseweg oder im Fall von **Fe(III)14Cl** ein Teil des gelösten Sauerstoffs über den Cytochrom P450 Mechanismus verbraucht wurde (Abb. 50).

Um die Sauerstoffmessungen mit den UV/Vis-spektroskopischen Messungen vergleichen zu können, wurden alle Konzentrationen um den Faktor 5 angehoben. Das Verhältnis der Katalysatorkonzentration zur H₂O₂-Anfangskonzentration wurde dadurch gleichgehalten. Auch die Amplex Red[®] **58** Konzentration wurde angehoben, so dass das Konzentrationsverhältnis mit dem der zuvor durchgeführten Messungen übereinstimmte. Die Messwerte der peroxidase- und katalasemimetischen Anteile in Abhängigkeit vom Verhältnis Amplex Red[®] zu H₂O₂ sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8: Anteil des über den peroxidase- (PA) und katalasemimetischen (ausgedrückt in %-O₂) Weg verbrauchten H₂O₂ für die Eisen(III)-TAA Komplexe

Amplex Red / H ₂ O ₂	0		0.5		1		2.5	
	PA	% O ₂	PA	% O ₂	PA	% O ₂	PA	% O ₂
Fe(III)6Cl	0%	90 ± 2 %	12 ± 2%	74 ± 4%	10 ± 3%	70 ± 4%	21 ± 3%	55 ± 3%
Fe(III)7Cl	0%	88 ± 3%	40 ± 3%	49 ± 3 %	38 ± 4%	40 ± 3%	41 ± 4%	20 ± 2%
Fe(III)14Cl	0%	91 ± 2%	0%	81 ± 4%	0%	77% ± 4%	0%	72 ± 4%

Es zeigte sich, dass bei Zugabe eines Peroxidasesubstrates bei allen drei Komplexen der katalasemimetische Anteil sinkt (Abb. 50), da ein gewisser Teil des Wasserstoffperoxids nicht zu Sauerstoff umgesetzt wurde, sondern über die Peroxidasereaktion mit Amplex Red[®] **58** bzw. Sauerstoff über den Cytochrom P450 Mechanismus verbraucht wurde.

Fe(III)14Cl wirkte nur als Katalasemimetikum, da die Reaktion mit H₂O₂ durch sterische Hinderung vermutlich wesentlich schneller verläuft als die Reaktion mit Amplex Red[®] **58**. Da bei **Fe(III)7Cl** die geringste sterische Hinderung für Peroxidasesubstrate auftritt, konnte der Komplex je nach Substratkonzentration vorwiegend als Peroxidase- oder als Katalasemimetikum fungieren. Es zeigte sich weiterhin, dass mit steigender Amplex Red[®] Konzentration die Peroxidasereaktion bei den Komplexen **Fe(III)6Cl** und **Fe(III)7Cl** nur leicht variierte (Abb. 49 und Tab. 1) und der katalasemimetische Anteil (Tab. 8 und Abb. 50) sank, die Summe blieb aber weitgehend im Rahmen der Fehlergrenzen konstant, mit Ausnahme von **Fe(III)14Cl** und den Werten bei einem Amplex Red[®] H₂O₂ Verhältnisses von 2.5, da hier wahrscheinlich Sauerstoff für die Autooxidation von Amplex Red[®] **58** verbraucht wurde.

Die Abhängigkeit des bevorzugten Reaktionsweges vom Konzentrationsverhältnis Amplex Red[®] / H₂O₂ könnte darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund der höheren Substratkonzentration die Peroxidasereaktion ($v_2 = k_2 [\text{Amplex Red}^{\text{®}}] [\text{Cpd I}']$) vermutlich schneller verläuft als die Katalasereaktion ($v_1 = k_1 [\text{H}_2\text{O}_2] [\text{Cpd I}']$) (Abb. 51).

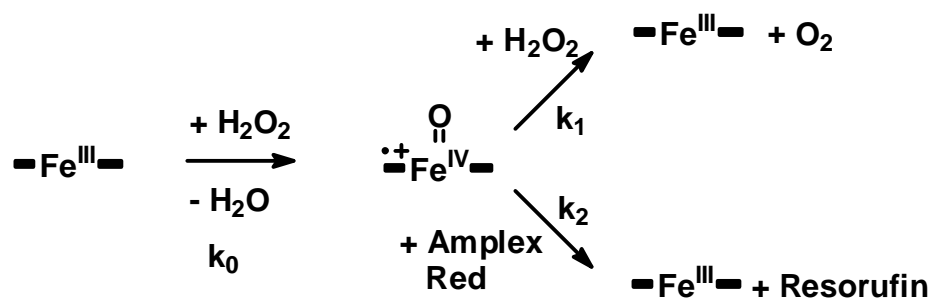
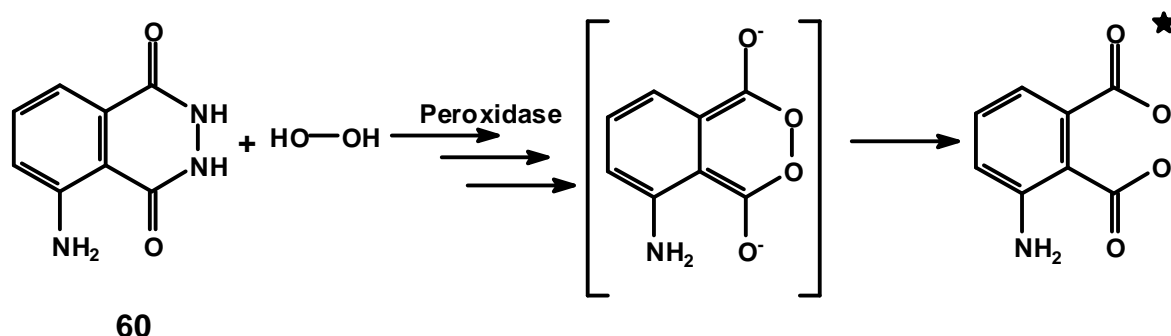


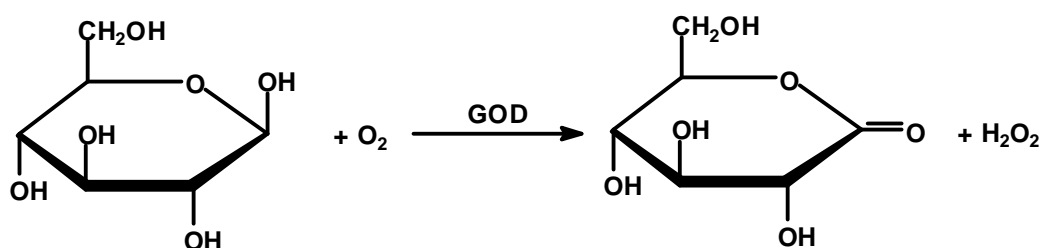
Abb. 51: Die Bildung von Compound I' erfolgt aus dem Eisen(III)-Komplex mit H_2O_2 mit der Geschwindigkeitskonstanten k_0 . Der Compound I' kann dann mit einem weiteren H_2O_2 zu Sauerstoff und dem Eisen(III)-Komplex reagieren mit der Geschwindigkeitskonstanten k_1 oder mit Amplex Red® mit der Geschwindigkeitskonstanten k_2 zu Resorufin und dem Eisen(III)-Komplex reagieren.

Vergleicht man die Messungen mit Amplex Red® **58** und 1,2-Phenylendiamin **23**, so wird aus beiden deutlich, dass alle drei Komplexe eine Sauerstoffaktivierung zeigen, die der des Cytochrom P450 ähneln könnte. Außerdem weisen die Komplexe **Fe(III)6Cl** und **Fe(III)7Cl** sowohl Katalase- als auch Peroxidaseeigenschaften auf, wobei **Fe(III)7Cl** in beiden Fällen mehr Peroxidasesubstrat durch H_2O_2 umgesetzt als **Fe(III)6Cl** unter denselben Bedingungen. Dies könnte dadurch begründet sein, dass das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k_1/k_2 in Abb. 51 für **Fe(III)6Cl** größer ist als für **Fe(III)7Cl** und somit bei **Fe(III)6Cl** die Katalase- gegenüber der Peroxidasereaktion schneller verläuft. **Fe(III)14Cl** zeigt neben der Sauerstoffaktivierung nur Katalase- und keine Peroxidaseeigenschaften. Dies könnte bedeuten, dass das Verhältnis k_1/k_2 hier noch wesentlich größer ist als bei **Fe(III)6Cl**. Somit liefere die Katalasereaktion im Vergleich zur Peroxidasereaktion so schnell ab, dass das H_2O_2 vollständig zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt und kein Peroxidasesubstrat durch H_2O_2 oxidiert wird. Vergleicht man den Anteil an H_2O_2 der für die Peroxidasereaktion in den Reaktionen mit 1,2-Phenylendiamin **23** und Amplex Red® **58** verwendet wurde miteinander, so fällt auf, dass die Werte bei 1,2-Phenylendiamin **23** mit 100 % für **Fe(III)7Cl** und 48 % für **Fe(III)6Cl** deutlich höher liegen als beim Amplex Red® **58**, hier waren es bei gleichem Substrat- H_2O_2 - Verhältnis von 2.5 nur 41 % für **Fe(III)7Cl** und 21 % für **Fe(III)6Cl**. Dies könnte daran liegen, dass 1,2-Phenylendiamin **23** leichter oxidierbar ist als Amplex Red® **58** und somit die Peroxidasereaktion schneller ablaufen kann. Somit spielen für die Peroxidaseeigenschaften neben der Struktur des Komplexes auch noch das H_2O_2 -Substratverhältnis und das Redoxpotential des Substrates eine Rolle.

4.2.3 Untersuchungen mit Luminol^[73, 74]



Als weiterer Nachweis für die peroxidasemimetische Reaktion wurde die Chemilumineszenz von Luminol **60** (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion), die durch die Oxidation mit Wasserstoffperoxid und Peroxidase hervorgerufen wird, bestimmt. Die Messung wurde unter kontinuierlicher Wasserstoffperoxidfreisetzung über das Glucose / Glucoseoxidase (GOD)-System bei 37°C bei pH 7.2 über einen Zeitraum von 10 – 12 Stunden durchgeführt.



Hierbei stellte sich heraus, dass durch die native Peroxidase ein sehr starker Anstieg in der Chemilumineszenz bereits zu Beginn der Reaktion erzielt wurde und nach einer Stunde keine weitere Lumineszenz auftrat, dieser Effekt beruht auf der literaturbekannten Inaktivierung der Peroxidase^[75]. Im Gegensatz dazu stieg die Lumineszenz durch die TAA-Eisen(III)-komplexe bei den Komplexen nur gering an. Der Komplex **Fe(III)6Cl** zeigte die stärkste und **Fe(III)14Cl** die geringste Chemilumineszenz der drei Komplexe (Abb. 52). Jedoch wurde die geringe Lumineszenz über einen Zeitraum von mehreren Stunden aufrecht gehalten. Es zeigt sich also, dass eine kontinuierliche peroxidasemimetische Reaktion abläuft, die über die Zeit betrachtet nicht unerheblich ist.

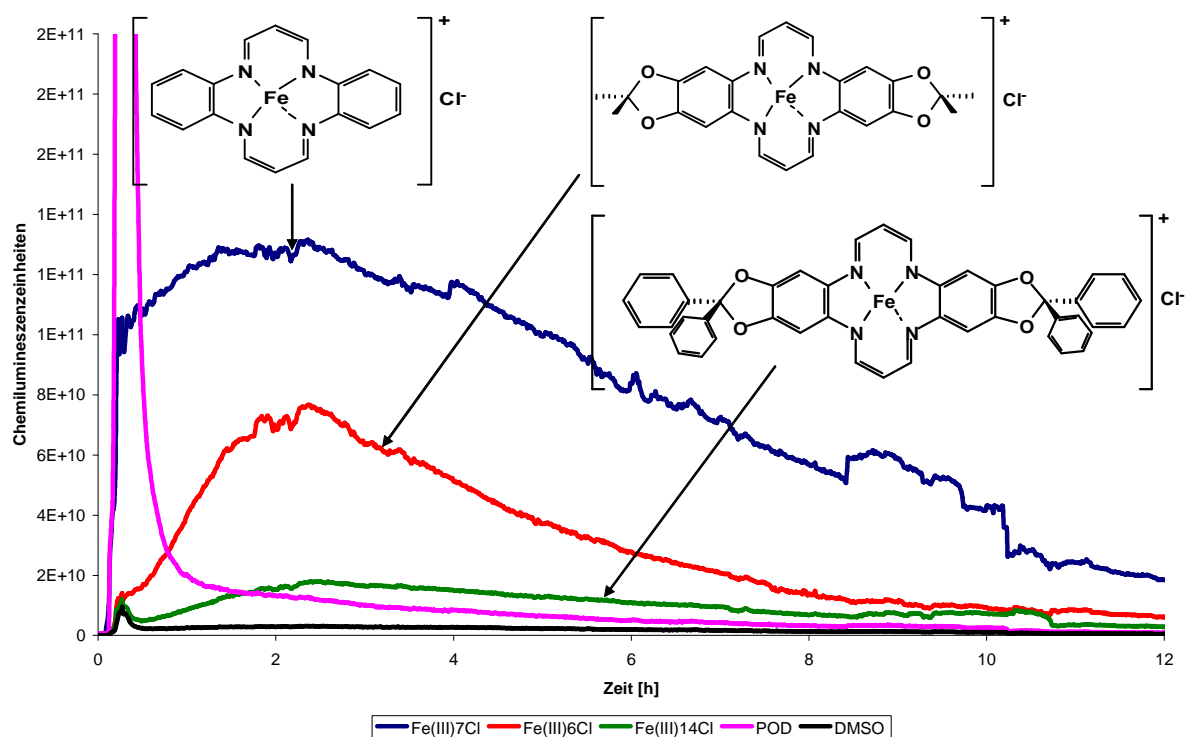


Abb. 52: Chemilumineszenz-Messungen (n=6) durch 50 μM Luminol bei kontinuierlicher H_2O_2 Freisetzung durch GOD 100 (U/L)/Glucose (10 mM) bei Komplexkonzentrationen von 10 μM sowie Peroxidase (2.5 U/L). Gemessen in Phosphatpuffer bei pH 7.3 und 37°C.

5 Untersuchungen im zellulären System

Bei Untersuchungen an Rattenhepatozyten und Leberendothelzellen zeigten sowohl eine Inkubation der Zellen mit dem katalasemimetischen TAA Eisen(III)-Komplex **Fe(III)6** als auch eine Inkubation mit dem freien TAA-Liganden **6**^[33] protektive Effekte gegen Kälteschädigung und eiseninduzierte Zellschädigung. Die Protektivität des freien Liganden war jedoch deutlich größer. Dieser größere Effekt wurde damit begründet, dass der TAA-Ligand **6** in der Zelle freies, chelatisierbares Eisen, das hauptsächlich in der Oxidationsstufe +II vorliegt, komplexiert, so dass es nicht mehr für eiseninduzierte Zellschädigungen zur Verfügung steht. Anschließend kann der so gebildete Komplex nach Oxidation, z.B. durch H₂O₂, zusätzlich als Katalasemimetikum wirken und somit H₂O₂ zu Sauerstoff abbauen.

5.1 Untersuchungen per ESI-Massenspektrometrie

Um die Hypothese der Komplexbildung von Eisen durch den TAA-Liganden **6** in der Zelle zu beweisen, wurde versucht in Zelllysaten von mit dem TAA-Liganden **6** beladenen Rattenhepatozyten per ESI-Massenspektrometrie den Eisen-Komplex **Fe(III)6** nachzuweisen. Diese ersten Versuche fielen hierbei jedoch negativ aus. Daher wurden zusätzlich zur Inkubation mit dem freien Liganden **6** die Zellen noch mit dem Eisen(III)-8-hydroxychinolin-(1:2)-Komplex (**Fe8-HQ**) beladen, um die Konzentration an freiem Eisen in der Zelle deutlich zu erhöhen und somit das Gleichgewicht weiter auf die Komplexseite zu verschieben, wodurch die Konzentration an **Fe(III)6** im Lysat erhöht werden sollte. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit dem Liganden **6** bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand vollständig entfernt und die Zellen für mit **Fe8-HQ** bei 37°C nachinkubiert. Als Medium wurde für beide Inkubationen eine Ringerlösung, die mit 20mM Pipes bei pH 7.35 gehalten wurde, statt des üblichen Zellmediums verwendet, um möglichst wenig Fremdstoffen zu verwenden, die die ESI-Messungen stören könnten. Die Zellen wurden nach der beendeten Inkubation mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Zugabe einer Detergenz-Lösung, z. B. 0.5% SDS in Ethanol oder 0.1% Triton X-100 in Phosphatpuffer, lysiert. Die Zelllysate wurden anschließend per ESI-Massenspektrometrie untersucht. Hierbei stellte sich bald heraus, dass viele Lysemethoden nicht geeignet waren, da durch die Lyse-

Detergentien, wie SDS (Natriumdodecylsulfat) in Ethanol oder Triton X-100 in Puffer mögliche Komplexsignale überlagert bzw. unterdrückt werden könnten. Dies wurde durch Vergleichsmessungen mit Detergentien und synthetisiertem Komplex **Fe(III)6Cl** überprüft. Die ESI-Massenspektren der Vergleichsmessung mit 20 μM **Fe(III)6Cl** und ohne Komplex sind in Abb. 53 für 0.1% Triton X-100 in Ethanol exemplarisch dargestellt.

Hier ist zu sehen, dass sich die Spektren nicht wesentlich voneinander unterscheiden und kein Komplexsignal bei 521.0674 auftritt. Bei Untersuchungen mit anderen Detergentien, wie z.B. 0.1% SDS in Ethanol, trat ebenfalls kein Komplexsignal auf.

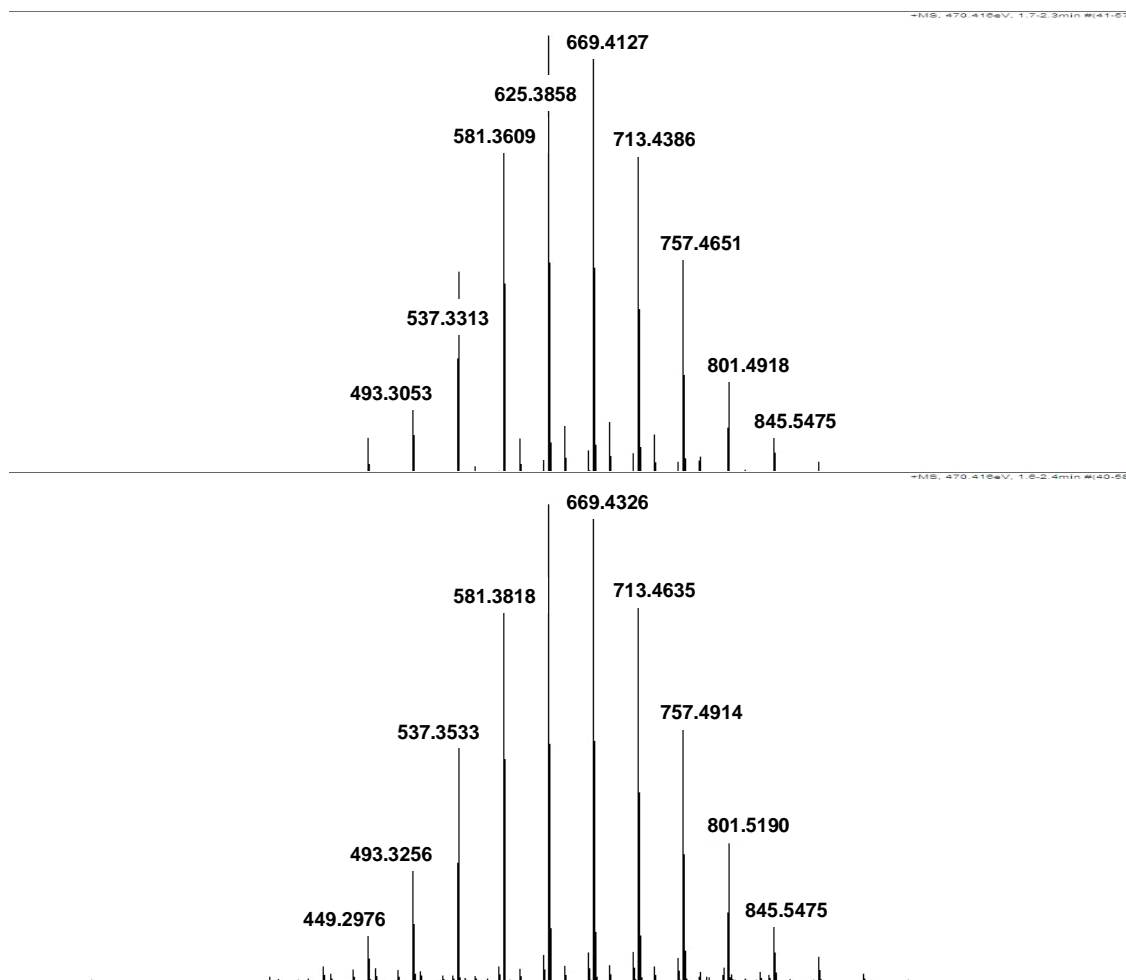


Abb. 53: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) oben Lösungsmittelkontrolle 0.1% Triton X-100 in Ethanol, unten Probe **Fe(III)6Cl**, 20 μM in 0.1% Triton X-100 in Ethanol

Daher wurde die Lysemethode geändert, so dass auf Detergentien verzichtet werden konnte und die Zellen nur durch Ethanol und mechanische Zerstörung lysiert wurden.

Außerdem wurden größere Zellbestandteile, die die Ionenquelle verunreinigen und somit die Messung erschweren würden, durch Abfiltrieren über einen 30 kDa Membranfilter entfernt. Jedoch waren auch diese Versuche nicht erfolgreich. Aus den in Abb. 54 gezeigten ESI-Massenspektren der Lösungsmittelkontrolle, bei der anstelle der Ligandenlösung bzw. der **Fe8-HQ**-Lösung das gleiche Volumen an DMSO verwendet wurde, und den mit Ligand **6** und **Fe8-HQ** inkubierten Zellproben ist nur das Ligand-Signal bei 432.1596 zu erkennen. Deshalb wurde eine andere Methode zum Nachweis des Komplexes gewählt.

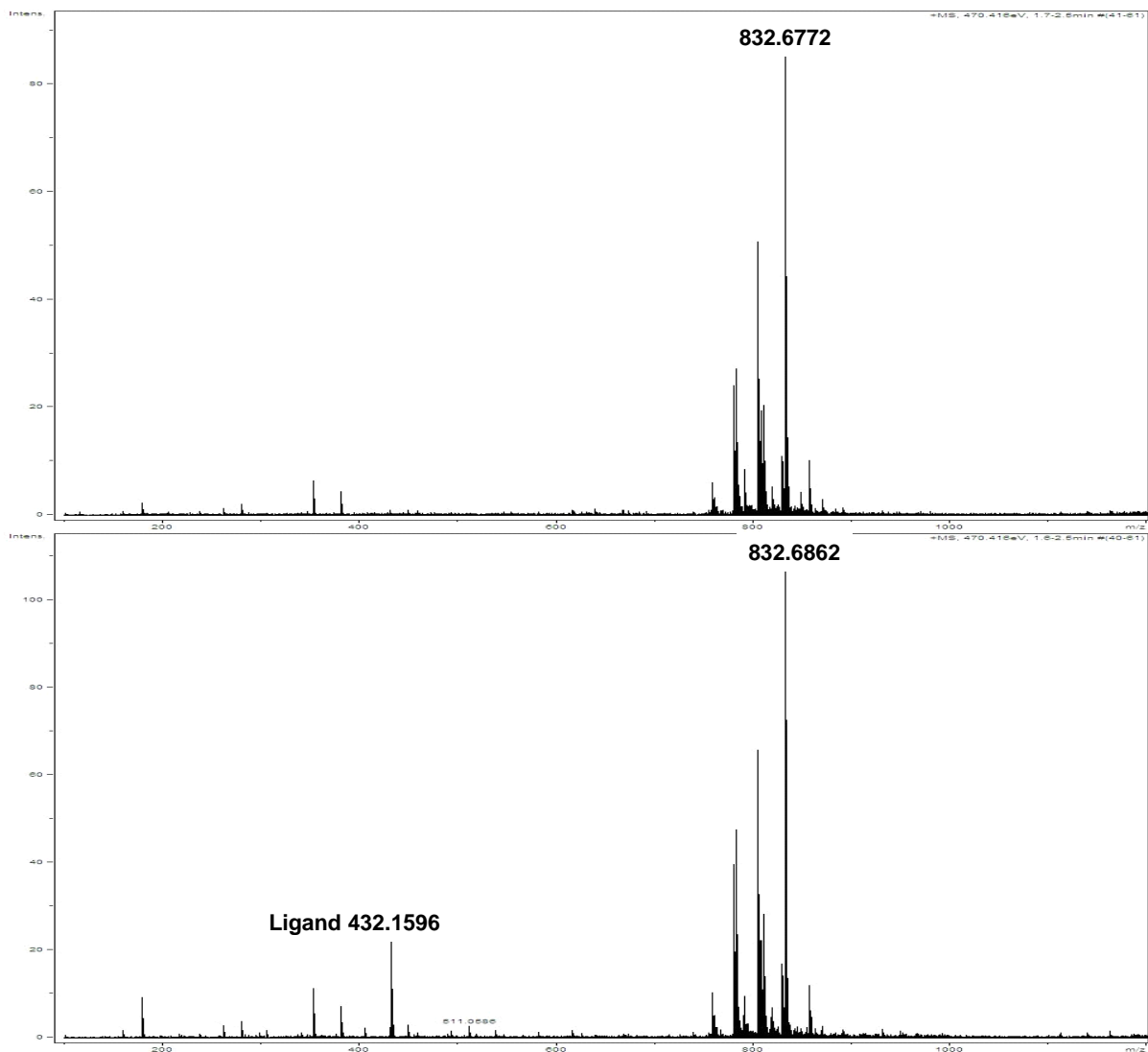


Abb. 54: ESI Spektren (positiver Ionenmodus) von Zelllysat-Proben von Rattenhepatozyten in Ethanol: oben Lösungsmittelkontrolle (150 μ L DMSO in 30 mL Ringerlösung (20mM PIPES, pH 7.35), 2 h, 45 μ L DMSO in 30 mL Ringerlösung (20mM PIPES, pH 7.35), 2 h), unten mit Ligand **6** (Vorinkubation 20 μ M (150 μ L einer 4mM Stammlösung in DMSO auf 30 mL), 2 h) und **Fe8-HQ** (15 μ M (45 μ L einer 10mM Stammlösung in DMSO auf 30mL), 2 h) beladene Zellen

5.2 Untersuchungen mittels Sauerstoffmessungen

Es wurde versucht, über die Sauerstofffreisetzung aus Wasserstoffperoxid eine Aussage über die Bildung des Komplexes **Fe(III)6** zu erhalten. Hierbei musste sichergestellt werden, dass keine Katalase (MW: 244-250 kDa, bestehend aus 4 Untereinheiten von 60-65 kDa^[41]) in den Proben vorhanden ist und die zum Lysieren verwendeten Detergentien die Sauerstoffbildung aus H₂O₂ durch den Komplex **Fe(III)6** nicht beeinflussen. Hierzu wurden wiederum 30 kDa Membranfiltereinsätze für Eppendorf-Gefäße verwendet, um durch Zentrifugieren über diesen Membranfilter die native Katalase abzutrennen. Hierbei musste die Belastungsgrenze des Filters von 15000 x g beachtet werden.

Um die für die Lyse verwendeten Detergentien hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität des Eisen(III)-Komplexes zu untersuchen, wurde Sauerstofffreisetzung mit einem synthetisierten **Fe(III)6** Komplex in den einzelnen Lysemedien untersucht. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 55 dargestellt. Hierbei sind die jeweilige Sauerstofffreisetzung bei einer frisch angesetzten Probe (frisch), einer 1 h im Lysemedium aufbewahrten Probe (1 h), eine 3 h alten Probe (3 h) und einer nach 3 h über einen Membranfilter filtrierten Probe (filtriert nach 3h) bestimmt worden.

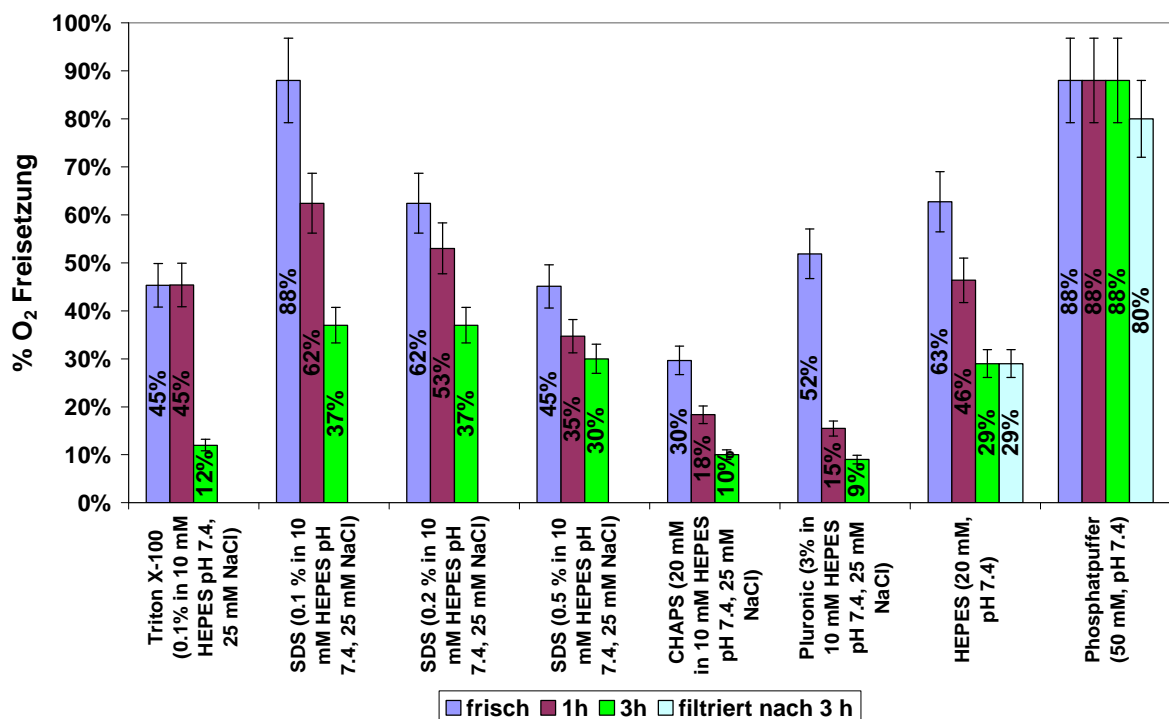


Abb. 55: Sauerstoffausbeuten bei Messungen mit 2 μ M Fe(III)6Cl und 100 μ M H₂O₂ in jeweils 500 μ L der möglichen Lyse-Detergentien bzw. Grundpuffer

Aus den Messwerten der Abb. 55 kann man entnehmen, dass bei frisch angesetzten Proben bei den meisten der für die Lyse verwendeten Detergentien die Sauerstoffausbeute wesentlich geringer ausfällt als beim Phosphatpuffer. Lediglich die 0.1% SDS Lösung erreicht den Wert von 88%. Wenn man die Proben noch länger stehen lässt, wird der Effekt noch deutlicher (Abb. 55). Hierbei liegen die Sauerstoffausbeuten bei allen Detergentien deutlich niedriger als beim Phosphatpuffer. Die niedrigeren Sauerstoffausbeuten in den Detergenzlösungen können evtl. auf die Bildung von Micellen oder auf die Komplexbildung des Eisens durch die Detergentien an der 5. und 6. Koordinationsstelle des Eisenkomplexes zurückzuführen sein, da hierdurch die Aktivität des Komplexes **Fe(III)6** herabgesetzt wird. Da jedoch zwischen Lyse und Sauerstoffmessung mehrere Stunden durch Transport der Proben und Abtrennen der nativen Katalase über einen 30 kDa Membranfilter verging, muss die Restaktivität des Komplexes möglichst hoch sein. Daher wurde eine andere Lysemethode verwendet. Zur Lyse wurden die Zellen abgeschabt, in hypoosmolarem Phosphatpuffer aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend langsam wieder aufgetaut, hierbei platzt die Zellmembran und die Zellen werden lysiert. Die so erhaltenen Zelllysate wurden nun 10 min bei 13000 x g zentrifugiert, der Überstand in der Zentrifuge bei 10000 x g durch einen Membranfilter filtriert, das Filtrat 1:1 mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7.3 verdünnt und damit in der Clark-Elektrode die Sauerstofffreisetzung mittels Zugabe von H₂O₂ bestimmt. Es zeigte sich an allen sieben Messtagen, dass die Katalase über den Membranfilter vollständig abgetrennt wurde, da in den Lösungsmittelkontrollen, bei denen die Rattenhepatozyten nur mit den verwendeten Lösungsmitteln ohne weitere Zusätze inkubiert wurden, nur sehr geringe Sauerstoffmengen (2% ± 2%) freigesetzt wurden (s. Abb. 56 und Abb. 57 DMSO-Kontrolle). Für die Versuche mit **Fe8-HQ** wurden die Zellen mit α-Tocopherol vorinkubiert, um Lipidperoxidation durch eiseninduzierte Zellschädigung weitgehend zu verhindern und damit längere Versuchszeiten zu ermöglichen. Die nur mit dem Eisen(III)-8-hydroxychinolin (**Fe8-HQ**) beladenen Zellen wurden bereits nach 45 Minuten lysiert, d.h. zu einem Zeitpunkt bei dem die Zellschädigung und damit ein Auslecken von Zellbestandteilen noch vernachlässigbar war. Bei der anschließenden Untersuchung wurde eine höhere Sauerstofffreisetzung beobachtet. Dieser Anteil ist auf die Umsetzung des H₂O₂ mit freien Eisenionen zurückzuführen.

Mit durchschnittlich $13\% \pm 3\%$ ist die Menge an freigesetztem Sauerstoff jedoch gegenüber der mit Ligand **6** und Eisen(III)-8-hydroxychinolin (**Fe8-HQ**) beladenen Zellproben (**TAA/Fe8-HQ** $68\% \pm 4\%$) (Abb. 56) oder den nur mit TAA-Liganden **6** beladenen Proben (**TAA** $63\% \pm 3\%$) (Abb. 57) signifikant niedriger. Aus den so erhaltenen Messwerten kann man nun schließen, dass die Sauerstofffreisetzung auf der Bildung des TAA-Eisen(III)-Komplexes **Fe(III)6** beruhen kann und somit die aufgestellte Hypothese bekräftigt wurde.

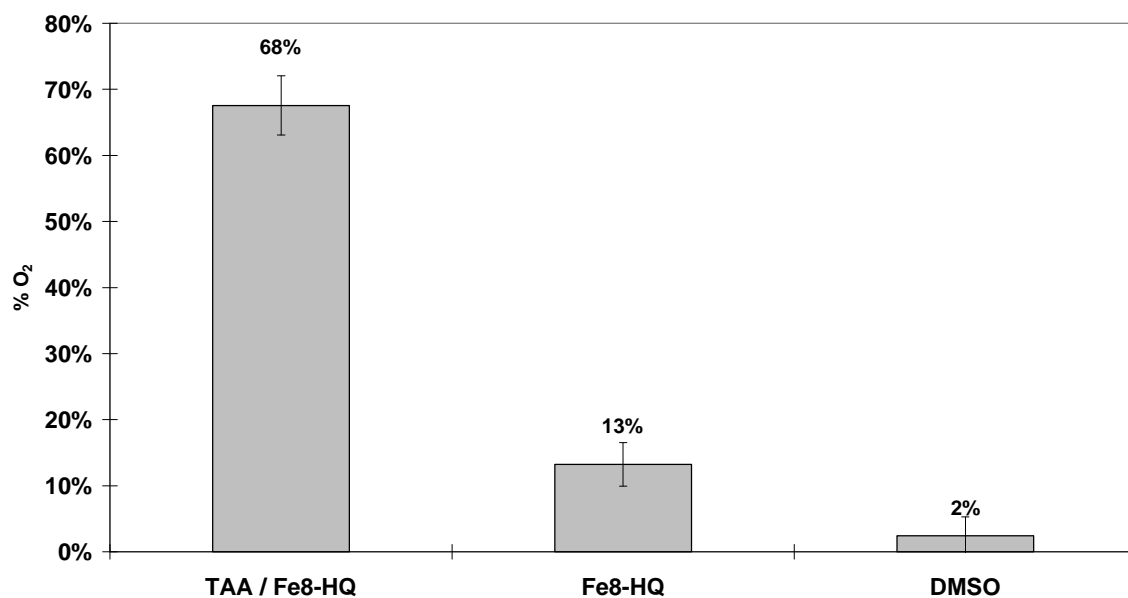


Abb. 56: Sauerstoffausbeuten bei der H₂O₂-Zersetzung durch Zelllysate von Rattenhepatozyten (n=7) (20 h mit 60 µM α-Tocopherol vorinkubiert). TAA/Fe8-HQ: Vorinkubation mit Ligand **6** (20 µM, 2 h) und anschließend Inkubation mit Fe8-HQ (15 µM, 2 h), Fe8-HQ: Vorinkubation mit DMSO (1%, 2 h), anschließend Inkubation mit Fe8-HQ (15 µM, 45 min), DMSO: Lösungsmittelkontrolle: Vorinkubation mit DMSO (1%, 2 h), Inkubation mit DMSO (1%, 2 h) alle Proben bei einer H₂O₂-Konzentration von 100 µM. Die Angabe % O₂ bezieht sich auf die durch Katalase freigesetzte Menge an Sauerstoff bei 100 µM H₂O₂.

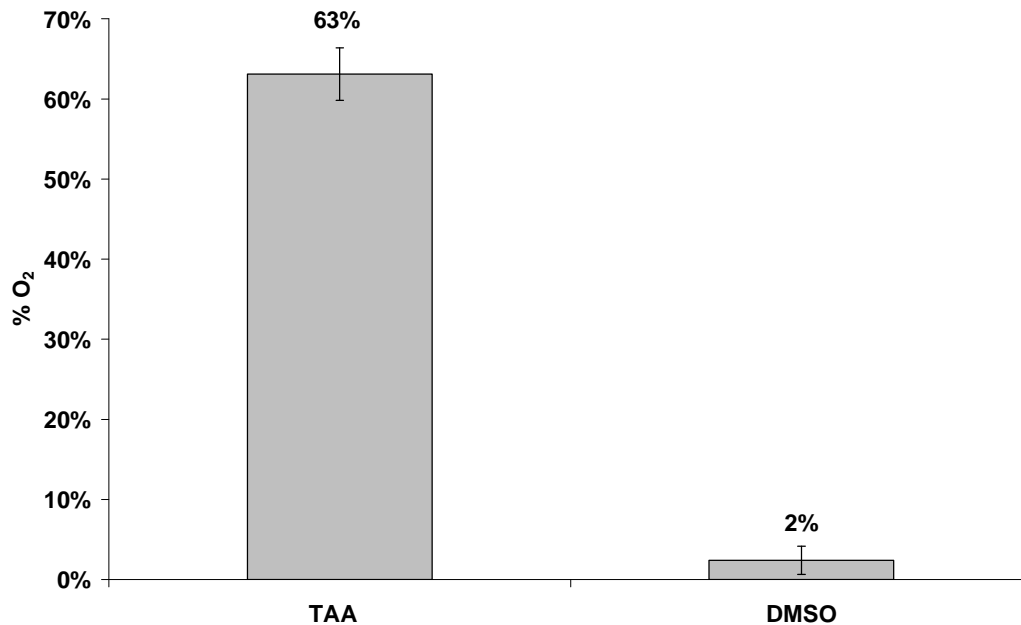


Abb. 57: Sauerstoffausbeuten bei der H_2O_2 -Zersetzung durch Zelllysate von Rattenhepatozyten ($n=6$). TAA: Vorinkubation mit Ligand 6 (20 μM , 2 h), DMSO: Lösungsmittelkontrolle: Vorinkubation mit DMSO (1%, 2 h), Inkubation mit DMSO (1%, 2 h) alle Proben bei einer H_2O_2 -Konzentration von 100 μM . Die Angabe % O_2 bezieht sich auf die durch Katalase freigesetzte Menge an Sauerstoff bei 100 μM H_2O_2 .

Zur Bestimmung der Konzentration an gebildetem Komplex **Fe(III)6** wurde die Anfangsbildungsgeschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung bei den Messungen herangezogen und durch Interpolation mit bereits bestimmten Anfangsbildungsgeschwindigkeiten mit verschiedenen Komplex- und H_2O_2 -Konzentrationen^[31] verglichen (Abb. 58). Es wurden Messungen mit Komplexkonzentrationen von 2.5 μM , 5.0 μM und 7.5 μM und einer H_2O_2 -Konzentration von 125 μM , 250 μM , 375 μM und 500 μM bereits von Baute durchgeführt und die jeweiligen Anfangssauerstoffbildungsgeschwindigkeiten $v(\text{O}_2)$ in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration aufgetragen (Abb. 58).^[31] Hierdurch ergaben sich für die drei Komplexkonzentrationen drei Retentionsgeraden.

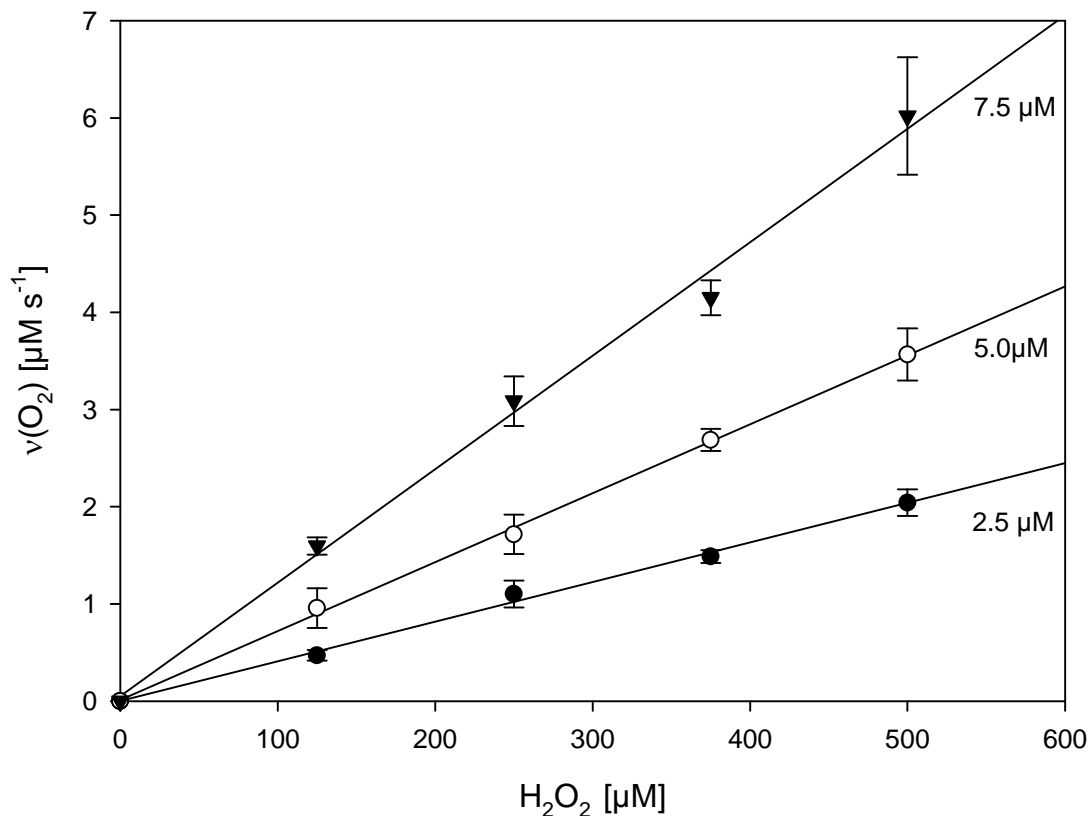


Abb. 58: Anfangssauerstoffbildungsgeschwindigkeiten $v(\text{O}_2)$ in Abhängigkeit von $[\text{H}_2\text{O}_2]$ bei Konzentrationen von 7.5 μM , 5.0 μM und 2.5 μM Fe(III)6Cl ^[30, 31]

Da bei den Zelllysate-Messungen eine H_2O_2 -Konzentration von 100 μM verwendet wurde, wurden die Anfangssauerstoffbildungsgeschwindigkeiten für eine Messkonzentration von 100 μM H_2O_2 aus den in Abb. 58 abgebildeten Regressionsgeraden bestimmt. Um die Komplexkonzentration in den Lysaten zu bestimmen, wurden die verwendeten Komplexkonzentrationen von 2.5 μM , 5.0 μM und 7.5 μM gegen die aus Abb. 58 ermittelten Anfangsbildungsgeschwindigkeiten $v(\text{O}_2)$ aufgetragen (Abb. 59).

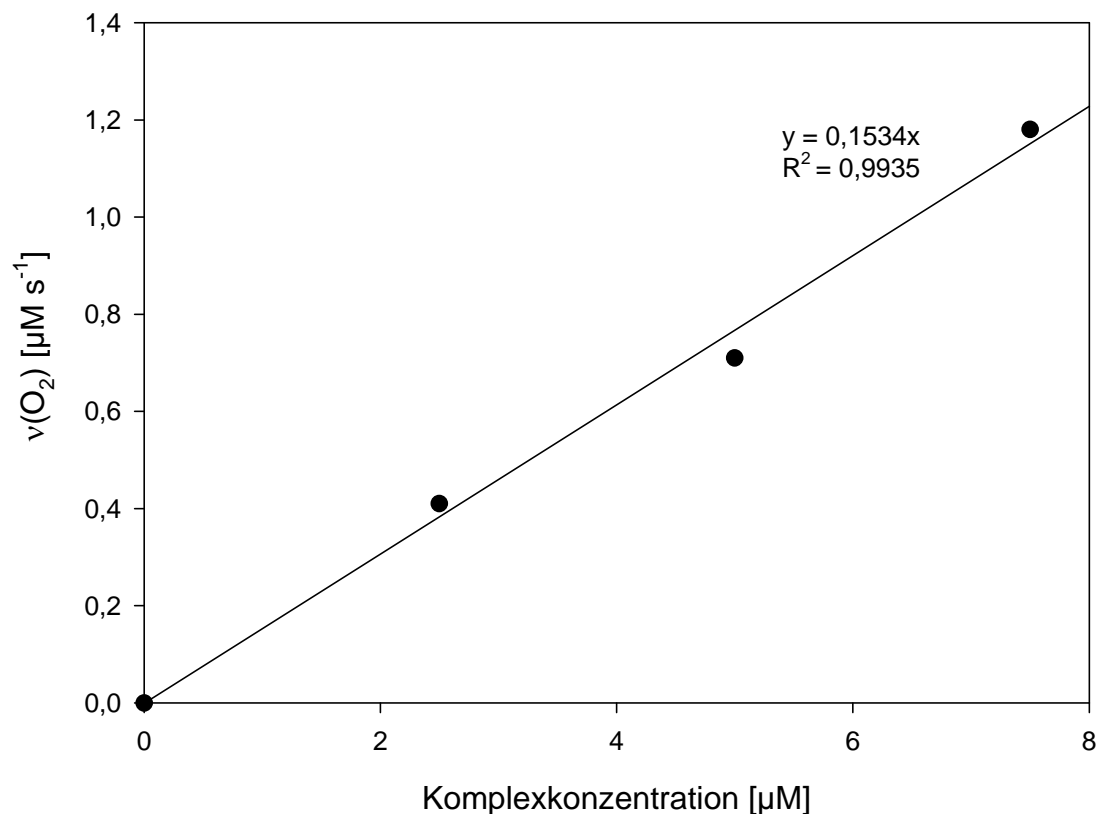


Abb. 59: Abhängigkeit der Anfangssauerstoffbildungsgeschwindigkeiten von der $[\text{Fe(III)}_6\text{Cl}]$ bei $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$. Aus der Geradengleichung $y = 0.1534x$ lassen sich anhand von ermittelten Anfangsbildungsgeschwindigkeiten die Komplexkonzentrationen bestimmen.

Hieraus ergab sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Komplexkonzentration und der Anfangssauerstoffbildungsgeschwindigkeit. Nun wurden die Anfangssauerstoffbildungsgeschwindigkeiten in den Zelllysaten ermittelt, indem über ein geringes Zeitintervall Δt die Spannungsänderung ΔU gemessen wurde. Die Anfangssauerstoffbildungsgeschwindigkeit $v(\text{O}_2)$ ergibt sich nach Gl. 15. Hierbei ist $[\text{O}_2]_{\text{max}}$ die maximal nach Gl. 7 mögliche Sauerstoffmenge und ΔU_k die bei der Kalibrierung mit Katalase bestimmte Spannungsänderung.

$$v(\text{O}_2) = \frac{\Delta U \cdot [\text{O}_2]_{\text{max}}}{\Delta U_k \cdot \Delta t} \quad (\text{Gl. 15})$$

Für die Messungen mit den Zelllysaten, die mit dem Liganden **6** und Eisen(III)-8-hydroxychinolin **Fe8-HQ** beladen wurden, ergaben sich Anfangsgeschwindigkeiten von $0.06676 \pm 0.0092 \mu\text{M s}^{-1}$, so dass die Konzentration von **Fe(III)6** im Lysat auf Grund der messbedingten Verdünnung der Lösung von 1:1 bei $0.8703 \pm 0.1204 \mu\text{M}$ liegt. Die Werte der Anfangsbildungsgeschwindigkeiten bei den Lysaten der nur mit dem TAA-Liganden **6** beladenen Zellen lagen bei $0.01791 \pm 0.00275 \mu\text{M s}^{-1}$. Daraus ergaben sich Konzentrationen in den Lysaten von $0.2670 \pm 0.0369 \mu\text{M}$.

Da eine ähnliche Konzentration auch bei den Zelllysaten für die Massenspektrometrie aufgetreten sein sollte, konnten bei den ESI-Messungen keine Komplexsignale detektiert werden, da die Konzentration zu gering war (die Nachweisgrenze des Komplexes in wässriger Lösung liegt bei etwa $10 \mu\text{M}$). Über die Konzentration im Zelllysate lassen sich Rückschlüsse auf die Zellkonzentration an gebildetem Komplex **Fe(III)6** treffen. Hierzu musste die Anzahl der Zellen ($1.03 \cdot 10^7$), die lysiert wurden, durch Zählen unter dem Lichtmikroskop bestimmt werden, da so eine Aussage über das Zellvolumen ($52 \mu\text{L}$) und somit die in den Zellen vorhandene Komplexkonzentration getroffen werden konnte. Hierbei wurde eine intrazelluläre Komplexkonzentration bei einem Lysevolumen von $600 \mu\text{L}$ von $10.44 \pm 1.44 \mu\text{M}$ für die mit dem Liganden **6** und Eisen(III)-8-hydroxychinolin beladenen Proben und eine Konzentration von $2.80 \pm 0.43 \mu\text{M}$ für die nur mit Ligand **6** beladenen Zellen bestimmt.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, nicht makrozyklische Eisen(III)-Komplexe von vierzählige Stickstoff-Liganden auf der Basis des Salophens zu synthetisieren und sie hinsichtlich ihrer möglichen katalasemimetischen Eigenschaften zu untersuchen. Das Liganden-System wurde so gewählt, dass ein durchgängig, konjugiertes System vorhanden ist, das ein Radikalkation möglichst gut stabilisieren kann. Hierzu wurden die neuen Liganden **15**, **16**, **44** und **47** analog den literaturbekannten Liganden **17**^[46, 47, 60], **36**^[46, 47, 60], **43**^[54] und **48**^[62]. Aus Ihnen wurden der literaturbekannte Komplex **Fe(III)48**^[63] und die restlichen in Abb. 60 dargestellten, neuen Eisen(III)-Komplexe erfolgreich synthetisiert und hinsichtlich ihrer katalasemimetischen Eigenschaften untersucht.

Dabei zeigte sich, dass unter annähernd physiologischen Bedingungen nur recht geringe Sauerstoffausbeuten von weniger als 10 % erzielt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass H₂O₂ lediglich stöchiometrisch, nicht jedoch katalytisch zu Sauerstoff abgebaut wird. Nur der Komplex **Fe(III)47** zeigte eine Aktivität von mehr als 20%, jedoch kann auch hierbei nicht von einer katalasemimetischen Reaktion gesprochen werden, da hierbei das Verhältnis O₂/Komplex nur bei 2.70 liegt. Auch hier kann eher von einer Redoxreaktion als von einer katalasemimetischen oder auch nur katalytischen Reaktion ausgegangen werden.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass all die nicht makrozyklischen Eisen(III)-Komplexe keine katalasemimetischen Eigenschaften aufweisen.

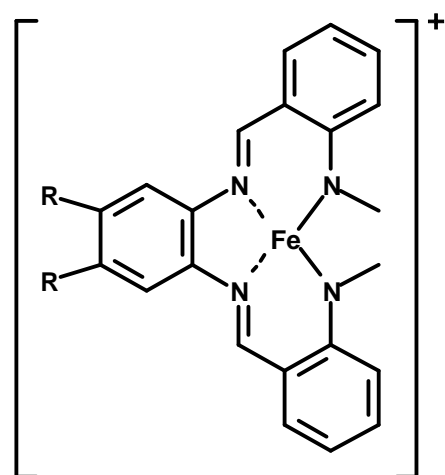
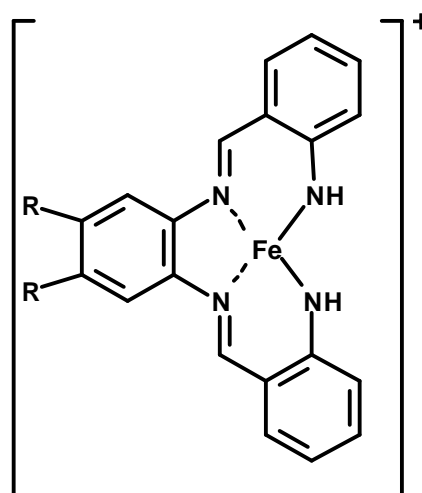
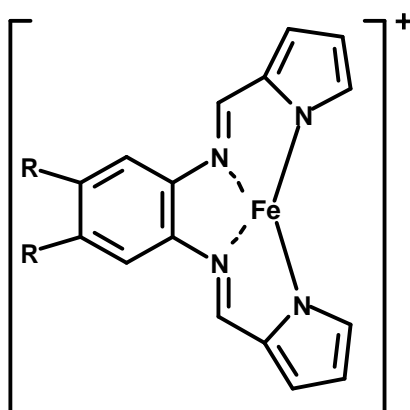
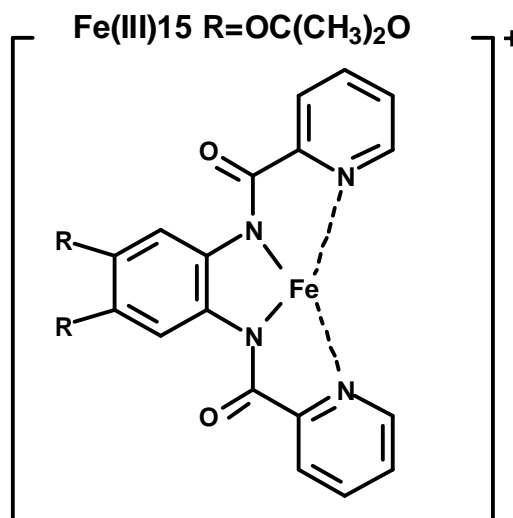
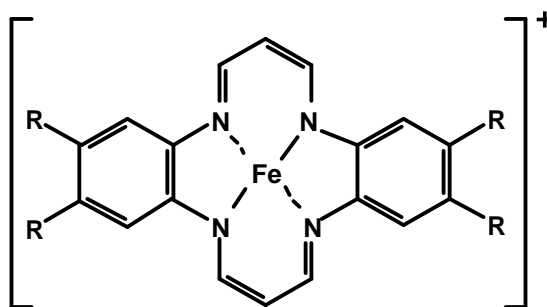
**Fe(III)36Cl** R= H**Fe(III)17** R= H**Fe(III)16Cl** R=OC(CH₃)₂O**Fe(III)43** R= H**Fe(III)44** R= OC(CH₃)₂O**Fe(III)15** R=OC(CH₃)₂O**Fe(III)46** R= H**Fe(III)47** R= OC(CH₃)₂O

Abb. 60: In dieser Arbeit untersuchte, nicht makrozyklische Eisen(III)-Komplexe

Außerdem war es Ziel dieser Arbeit die bereits im Arbeitskreis Sustmann erfolgreich als Katalasemimetika getesteten Eisen(III)-tetraaza[14]annulen-Komplexe **Fe(III)6Cl**, **Fe(III)7Cl** und **Fe(III)14Cl** hinsichtlich einer möglichen peroxidsemimetischen Wirkung zu untersuchen. Hierzu wurden Messungen unter annähernd physiologischen Bedingungen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und verschiedenen Peroxidasubstraten durchgeführt.



Fe(III)7 $R = H$

Fe(III)6 $R = OC(CH_3)_2O$

Fe(III)14 $R = OC(C_6H_5)_2O$

Abb. 61: Dargestellte und untersuchte TAA-Eisen(III)-Komplexe

Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle drei Komplexe Katalaseaktivität aufweisen. Die Komplexe **Fe(III)6** und **Fe(III)7** zeigten auch Peroxidaseeigenschaften. Dies kann damit begründet werden, dass die Enzyme Katalase und Peroxidase dieselben aktiven Zentren aufweisen und die unterschiedliche Reaktion lediglich durch die Proteinhülle beeinflusst wird. Da diese bei den Eisen(III)-TAA-Komplexen nicht vorhanden ist, weisen sie sowohl Katalase- als auch Peroxidaseeigenschaften auf. Hierbei zeigte sich, dass **Fe(III)14** mit $91 \pm 2 \%$ Sauerstoffausbeute zwar gute katalasemimetische Eigenschaften aufweist, während es vermutlich aufgrund der sterischen Hinderung durch die Phenylringe keine peroxidase-mimetischen Eigenschaften besitzt. Es ist anzunehmen, dass die Katalasereaktion gegenüber der Peroxidasereaktion in diesem Fall wesentlich schneller ist, da bei den Messungen auch eine cytochrom-P450-artige Sauerstoffaktivierung auftrat und diese bei Zugabe von H_2O_2 kurzfristig inhibiert wurde. Die Komplexe **Fe(III)6** und **Fe(III)7** zeigten mit $90 \pm 2\%$ bzw. $88 \pm 3\%$ Sauerstoffausbeute ebenfalls gute katalasemimetische Eigenschaften. Zusätzlich zeigten sie aber auch in allen Versuchen peroxidase-mimetische Eigenschaften. Wobei der Komplex **Fe(III)7** mit $41 \pm 4\%$ bei Amplex Red und $100 \pm 6 \%$ bei 1,2-Phenylendiamin als Substrat einem Substrat- H_2O_2 -Verhältnis von 2.5 den größten Umsatz über die Peroxidasereaktion lieferte. Dies lässt sich wiederum über die Struktur begründen, da kaum sterische Hinderung am Zentralatom auftritt, können auch die räumlich anspruchsvolleren Peroxidase-substrate schnell ans aktive Zentrum gelangen und mit dem zweiten H_2O_2 -Molekül in echte Konkurrenz treten. Der Komplex **Fe(III)6** zeigte sowohl katalasemimetische

Sauerstoffentwicklung als auch einen Anteil an H_2O_2 von $21 \pm 3\%$ bei Amplex Red[®] und $48 \pm 6\%$ bei 1,2-Phenylendiamin, der über die Peroxidasereaktion abgebaut wird. Bei den Peroxidase-Messungen traten, wie bereits oben erwähnt, Reaktionen auf, bei denen das Peroxidasesubstrat in Anwesenheit von Komplex ohne Zugabe von H_2O_2 oxidiert wird. Dies könnte auf einer durch die Komplexe katalysierten Oxidation durch den gelösten Sauerstoff beruhen.

Das dritte Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu überprüfen, ob die Protektivität des TAA-Liganden **6** im zellulären System auf intrazellulärer Komplexbildung beruht, wodurch sowohl freies Eisen komplexiert als auch H_2O_2 durch das Katalasemimetikum abgebaut wird. Hierzu wurden zunächst Zelllysate von mit dem Liganden **6** beladenen Zellen, in denen die Eisenkonzentration durch Zusatz von Eisen-8-hydroxychinolin erhöht wurde, per ESI-Massenspektrometrie untersucht. Hier konnte jedoch nur der freie Ligand beobachtet werden. Daher wurden dann Zelllysate, aus denen durch Filtration über einen 30kDa-Membranfilter die Katalase abgetrennt wurde, in der Clark-Elektrode auf ihre katalasemimetische Aktivität untersucht. Hier konnte über die Bestimmung der Sauerstoffausbeute von $63 \pm 3\%$ für nur mit Ligand **6** und $68 \pm 4\%$ für zusätzlich mit Eisen-8-hydroxychinolin beladene Zellen über die katalasemimetische Reaktion eine intrazelluläre Komplexbildung wahrscheinlich gemacht werden. Zusätzlich konnte über die Anfangsgeschwindigkeit der Sauerstofffreisetzung die Komplexkonzentrationen in Lysat und Zelle berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Komplexkonzentrationen in Zelllysate und in den Zellen (berechnet aus der Anfangsgeschwindigkeit der Sauerstofffreisetzung bei einem Zellvolumen von 52 μL , einem Lysevolumen von 600 μL und einer Zelldichte von $6.8 \cdot 10^4$ Zellen/ cm^2)

Zelllysate	$v(\text{O}_2)$ [$\mu\text{M s}^{-1}$]	Konzentration von Fe(III)6 im Lysat [μM]	Konzentration von Fe(III)6 in der Zelle [μM]
6+ Fe8-HQ	0.06676 ± 0.0092	0.8703 ± 0.1204	10.44 ± 1.44
6	0.01791 ± 0.00275	0.2670 ± 0.0369	2.80 ± 0.43

Da die hierbei im Lysat gefundenen Komplexkonzentrationen auch bei den Messungen per ESI-Massenspektrometrie aufgetreten sein sollten, liegen sie aber deutlich unter der Nachweisgrenze für den Komplex, die etwa bei 10 μM liegt.

7 Experimenteller Teil:

7.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

7.1.1 Verwendete Geräte

Die **CHN-Elementaranalysen** wurden im mikroanalytischen Labor der Universität Duisburg-Essen mit einem Elemental Analyser 1010 CHNSO der Firma Carlo Erba durchgeführt. Die quantitativen Bestimmungen des Eisengehalts erfolgten ebenfalls dort über Atomabsorptionsspektroskopie mit einem Gerät der Firma Unicam, Modell 939.

Die Aufnahme der **Massenspektren** in Niederauflösung sowie in Hochauflösung für die **Molmassenfeinbestimmung** erfolgte mit einem Bruker Bio ESI-TOF Flugzeitmassenspektrometer. Hierbei wurde zur Ionisation Elektrospray verwendet. Proben wurden über eine Spritzenpumpe oder über eine HPLC-Anlage vom Typ Agilent Serie 1100 und einen automatischen Probengeber vom Typ Gerstel/CTC MPS3 aufgegeben.

Die **^1H - und ^{13}C -Kernresonanz-Spektren** wurden mit den Geräten Gemini XL 200 der Firma Varian oder DRX-500 der Firma Bruker erstellt. Die Aufnahme von zweidimensionalen NMR-Spektren erfolgte ausschließlich mit dem DRX-500-Spektrometer. Die chemischen Verschiebungen werden in der Einheit ppm angegeben. Als innerer Standard dienten die undeuterten Anteile der verwendeten deuterierten Lösungsmittel. Neben den konventionellen ^{13}C -NMR-Spektren wurden DEPT135- und DEPT95-Spektren zur Produktcharakterisierung verwendet.

Die Aufnahme der **Infrarot-Spektren** erfolgte mit dem FT-IR Spektrometer FTS 135 der Firma Bio-Rad. Die Spektren wurden als KBr-Pressling oder als Film gemessen.

ESR-Spektren wurden mit dem ESP 300E Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen.

Analytische Dünnschicht-**Chromatographie** wurde unter Verwendung von kommerziell erhältlichen DC-Platten mit Fluoreszenzindikator SIL G/UV₂₅₄ der Firma Macherey und Nagel oder Aluminiumoxid 60 F254 (neutral oder basisch) der Firma Fluka durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Anfärbung in einer Iod-Kammer oder durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm. Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 oder Aluminiumoxid (neutral oder basisch) der Firma Fluka als Adsorptionsmittel verwendet.

Die **Schmelzpunktbestimmung** (unkorrigiert) erfolgte mit dem Gerät 510 der Firma Büchi oder unter Verwendung eines Mikroskop-Heiztisches (Reichert Thermovar).

Die quantitative **Sauerstoff-Messung** wurde mit einer Clark-Elektrode DW1 mit einer Hansatech Control Box vom Typ CB1-D3 durchgeführt. Die Messdatenerfassung, Steuerung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms DigiS[®] an einem Personalcomputer.

Die angegebenen **pH-Werte** wurden mit einem Piccolo Plus ATC pH/C-Meter der Firma Hanna ermittelt.

Die **UV/Vis-Spektren** wurden an dem Gerät Cary 300 Bio der Firma Varian aufgenommen. Da dieses Spektrometer ein Zweistrahlgerät ist, konnten die Probe und der entsprechende Leerwert gleichzeitig gemessen werden. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit dem zugehörigen Scan-Programm. Die Spektren umfassten einen Wellenlängenbereich zwischen 250 nm und 500 – 700 nm.

Die **fluoreszenzspektroskopischen** Experimente wurden an dem Spektrometer FL 3095 der Firma J&M Analytische Mess-und Regeltechnik GmbH durchgeführt. Für alle Spektren wurden Quarzküvetten verwendet. Aufnahme und Auswertung erfolgte mit dem Programm „FL 3095-Fluoroscans“. Vor jeder Messung wurde eine automatische Hintergrundkorrektur vorgenommen.

Die **Chemilumineszenz-Messungen** wurden mit einem Hamatsu II Controller mit Hamatsu Argus 50 Image Prozessor und einem LKG 2202 Multitemp Thermostaten bei 37°C aufgenommen. Für alle Versuche wurden 12 Well Platten der Firma Becton Dickinson verwendet. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit dem Programm „Argus 50“.

7.1.2 Verwendete Chemikalien

Es wurden folgende Chemikalien verwendet:

Acros organics:

Hydrazinmonohydrat
2-Nitrobenzaldehyd 98 %
Tetrahydrofuran p.a.
N,N-Dimethylformamid
Picolinsäure

Appli Chem:

Salpetersäure 65 %
Wasserstoffperoxid 30 %

BDH Laboratory Supplies:

Chloroform p.a.
Dichlormethan p.a.
Essigsäureethylester
Hexan p.a.
Methanol p.a.

Fluka:

Aluminiumoxid für Chromatographie (Typ 507c; basisch; d = 0.05-0.15 mm)

Brenzkatechin 99 %

Celite 545

Cyclohexan

Eisen(III)-chlorid, wasserfrei

Essigsäure 98 %

Kaliumchlorid

Natrium

Natriumacetat, wasserfrei

Natriumborhydrid

Natriumcarbonat

Natriumdithionid

Nickel(II)acetattetrahydrat

N-Methylantranilsäuremethylester

Pd/C (10 %)

Pd/C (5 %)

1,2-Phenylendiamin

Phosphor(V)-oxid

2-Pyridylmethanol

p-Toluolsulfonsäuremonohydrat 99 %

Triphenylamin

Triphenylphosphit

Gibco:

Leibovitz L-15 Medium

Merck:

Aceton p.a.

2-Aminobenzylalkohol

Ammoniumeisen(II)sulfathexahydrat

p-Benzochinon

Benzophenon

Calciumchlorid

Dimethylsulfoxid p.a.

2[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-iperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES)

8-Hydroxychinolin

Kaliumchlorid,

Kaliumhydroxid

Kaliumdihydrogenphosphat

Magnesiumchlorid

Magnesiumsulfat

Natriumchlorid

Natriumdihydrogenphosphat

Natriumhydroxid

Nickel(II)acetat

Phosphorsäure

Salpetersäure, rauchend 100 %

Triethylamin

Triton X-100

Molecular Probes:

Amplex Red®

Glucoseoxidase

Katalase

Luminol

Peroxidase

Resorufin

PAA Laboratories:

Penizillin/Streptomycin

Riedel de Häen:

Ethandiol

Magnesiumsulfat

Mangan(II)carbonat

Roth:

Calciumchlorid, wasserfrei

Ethanol p.a.

Seesand

Serva:

Dexamethason

Gentamicin

Kollagen (Typ R)

Natriumdodecylsulfat

Rinderserumalbumin

Sigma-Aldrich:

Acetonitril p.a.

Chelex Resin 100

Chloroform-d₁Dimethylsulfoxid-d₆

Eisen(II)chlorid, wasserfrei

Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat

Fötales Kälberserum

9-Fluorenylmethylchlorformiat (Fmoc)

D-Glucose

L-Glutamin

Glutathion,

8-Hydroxychinolin

Imidazol

Kollagenase

Natriumsulfidhydrat

Palladium (10%) auf Aktivkohle

7.1.3 Trocknung der Lösungsmittel / Vorbereitung der Chemikalien

Tetrahydrofuran (THF) wurde mit Natrium zum Sieden erhitzt, bis sich aus dem zugesetzten Indikator Benzophenon das violett-farbene Ketylradikalanion bildete^[76]. Anschließend wurde das THF unter Argon frisch abdestilliert und unter Argon aufbewahrt.

Ethanol wurde mit 7.0 g Natrium und 27.5 g Phthalsäurediethylester je Liter versetzt, eine Stunde unter Rückfluss erhitzt und anschließend unter Schutzgas auf Molsieb 3Å destilliert.

Zur Herstellung des **Phosphatpuffers** wurden ca. 3 L einer 50 mM K_2HPO_4 -Lösung mit ca. 1.2 L einer 50 mM KH_2PO_4 -Lösung versetzt, bis pH = 7.2 erreicht wurde. Anschließend wurde der Phosphatpuffer über Nacht mit 1.50 g Chelex pro 50 mL Puffer, einem Chelator für Metallionen, versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Abdekantieren des Puffers vom Chelex erfolgte die Feineinstellung des Puffers auf pH = 7.2 mit ebenfalls gechelextem 50 mM K_2HPO_4 - und KH_2PO_4 -Lösungen.

Pyridin wurde unter Argon Schutzgasatmosphäre destilliert und unter Argon auf Molsieb 4Å aufbewahrt.

Bei der verwendeten **Katalase** handelt es sich um käufliche Rinderleberkatalase die 1:100 in Phosphatpuffer verdünnt wurde. Die Lösung wurde bei 0°C gelagert.

Die 10 mM **Wasserstoffperoxid**-Stammlösung wurde durch Verdünnung von 2µL Wasserstoffperoxidlösung (30 Gew %) mit 1958 µL Phosphatpuffer erhalten. Die Lösung wurde bei der Messung bei Raumtemperatur gelagert.

Von den zu untersuchenden **Eisenkomplexen** wurden 5 bzw. 10 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt. Diese Lösungen wurden während der Messung bei Raumtemperatur gelagert.

Die Stammlösungen von Katalase, Wasserstoffperoxid und den Komplexen wurden täglich frisch hergestellt und nicht länger als zwölf Stunden verwendet.

Das **1,2-Phenylendiamin 23** wurde vor der Verwendung im Ölpumpenvakuum sublimiert und anschließend unter Schutzgas im Dunkeln aufbewahrt.

Die Vorbereitung der Lösungen für die enzyymmimetischen Untersuchungen wird in Kapitel 7.4 beschrieben.

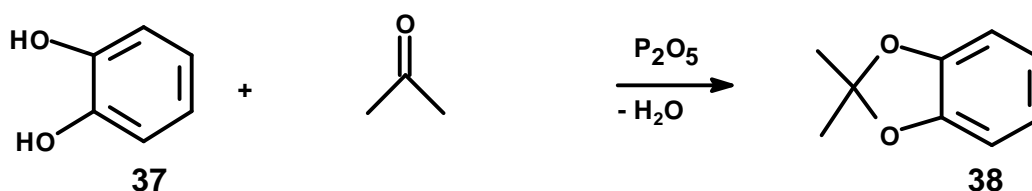
7.2 Versuchstiere für Zellmessungen

Die Experimente im zellulären System wurden mit Hepatozyten (Primärkultur) durchgeführt. Für die Hepatozytenisolation^[33] wurden männliche Ratten des Wistar-Stammes (280 - 350 g) vom Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen bezogen. Die Versuchstiere wurden unter Standardbedingungen (Temperatur: 21 ± 2 °C, konstanter Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h, Standardfutter und Wasser (*ad libitum*) in Übereinstimmung mit den geltenden Tierschutzgesetzen gehalten.

7.3 Synthese der Verbindungen

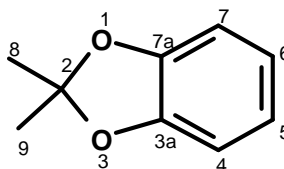
7.3.1 Synthese der Diamin-Vorstufen

7.3.1.1 2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol^[55, 56]

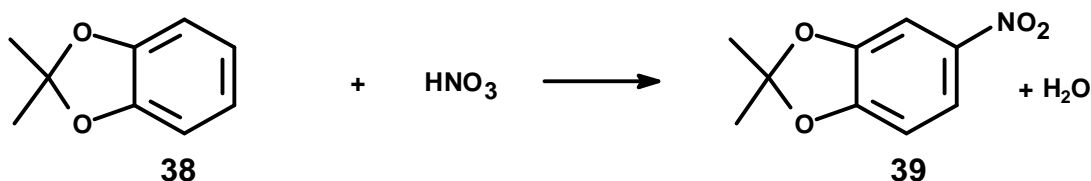


200 mL Aceton p.a. wurden im 1-L-Dreihalskolben mit KPG-Rührer und Rückflusskühler vorgelegt. Unter Rühren wurden 200.0 g (1.82 mol) Brenzkatechin **37** hinzugesetzt und bei 60°C gelöst. Die braune Lösung wurde, nach Entfernen des Ölbad, unter starkem Rühren portionsweise mit 320.0 g (2.25 mol) Phosphor(V)-oxid versetzt. Außerdem wurde mehrfach Aceton p.a. (insgesamt 150 mL) nachgefüllt, da ein Grossteil des Acetons bei der Zugabe des Phosphor(V)-oxid entwich. Nach beendeter Zugabe wurde eine weitere Stunde bei 60°C gerührt. Die Lösung wurde anschließend zwei Stunden abgekühlt. Die Oberschicht wurde von der hochviskosen schwarzen Unterschicht abdekantiert und bei Normaldruck fraktioniert destilliert.

Ausbeute an **38**: 128.6 g (0.86 mol; 47 % Lit.^[56] 70%; $n_D^{20} = 1.505$, Lit.^[55] 1.505; Sdp. 182°C, Lit.^[56] 182°C)

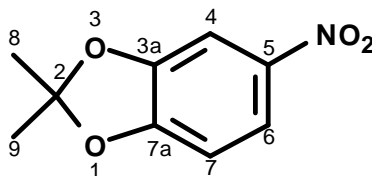


¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ [ppm] = 1.71 (s, 6 H, 8-H, 9-H); 6.79 (m, 4 H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H)

7.3.1.2 2,2-Dimethyl-5-nitro-1,3-benzdioxol ^[56]

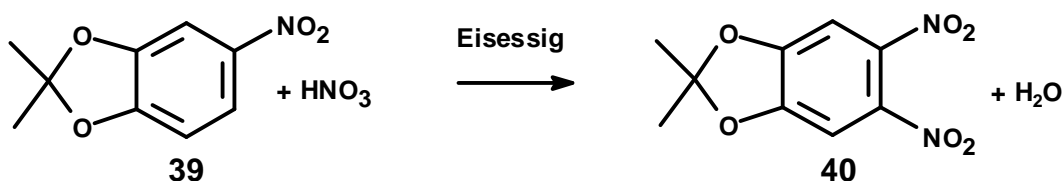
In einem 2-L-Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Innenthermometer und Zweihalsaufsatz mit Rückflusskühler und 500 mL Tropftrichter wurden 128.6 g (0.86 mol) 2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol **38** vorgelegt und 1.0 L einer 34 %igen Salpetersäure so langsam unter Rühren hinzugetropft, dass die Innentemperatur zwischen 20 und 30°C lag. Die Lösung färbte sich hierbei zunächst dunkelbraun, dann fiel ein brauner kristalliner Feststoff aus. Die Suspension wurde nach beendeter Säurezugabe noch 2 h bei Raumtemperatur (22°C) gerührt. Anschließend wurde sie auf 3°C gekühlt und der Niederschlag abgesaugt, getrocknet und aus Ethanol umkristallisiert. Der dabei erhaltene gelbe, feinkristalline Feststoff **39** wurde über Phosphor(V)-oxid getrocknet.

Ausbeute an **39** : 161.5 g (0.83 mol; 97%, Lit.^[56] 94%; Schmp. 91°C, Lit.^[56] 91°C)



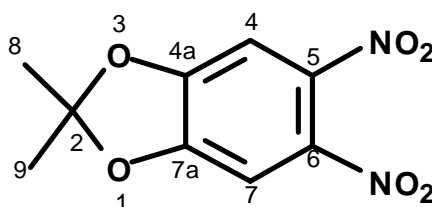
¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ [ppm] = 7.83 (dd, ³J{6-H, 7-H}= 8.6 Hz; ⁴J{6-H, 4-H}= 2.6 Hz; 1 H, 6-H); 7.56 (d, ⁴J{4-H, 6-H}= 2.6 Hz; 1 H, 4-H); 6.75 (d, ³J{7-H, 6-H}= 8.6 Hz; 1 H; 6-H); 1.71 (s, 6 H, 8-H, 9-H)

¹³C-NMR (125 MHz; CDCl₃): δ = 152.94 (7a-C); 147.81 (3a-C); 142.39 (5-C); 121.18 (2-C); 119.43 (6-C); 107.30 (7-C); 104.29 (4-C); 25.89 (8-C, 9-C)

7.3.1.3 2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-1,3-benzdioxol^[56]

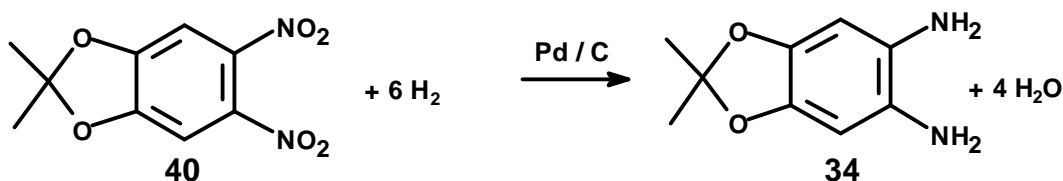
In einem 250-mL-Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Magnetrührer und Innenthermometer wurde eine Mischung aus 40.0 mL einer 100 %igen Salpetersäure und 20.0 mL Eisessig vorgelegt und auf 3°C gekühlt. Unter starkem Rühren wurden 10.2 g (52.3 mmol) 2,2-Dimethyl-5-nitro-1,3-benzdioxol **39** so langsam hinzugefügt, dass die Temperatur der Reaktionsmischung in einem Bereich zwischen 3 und 10°C lag. Nach beendeter Zugabe wurde die Mischung unter weiterer Kühlung 3 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 200 mL Eiswasser gegeben. Der Feststoff **40** wurde abgesaugt, mit etwas Eiswasser gewaschen, scharf abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute an **40**: 8.62 g (35.9 mmol; 69%, Lit.^[56] 55%; Schmp. 159°C, Lit.^[56] 159°C)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CDCl_3): δ [ppm] = 7.19 (s, 2 H, 4-H, 7-H); 1.76 (s, 6 H, 8-H, 9-H)

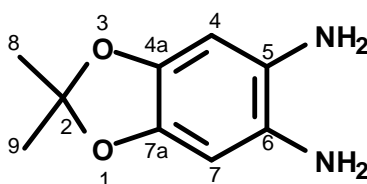
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz; CDCl_3): δ [ppm] = 150.04 (4a-C, 7a-C); 138.35 (5-C, 6-C); 123.98 (2-C); 104.73 (4-C, 7-C); 25.91 (8-C, 9-C)

7.3.1.4 2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin (Variante 1) ^[56]

10.0 g (41.6 mmol) 2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-1,3-benzodioxol **40** wurden in einem Glaseinsatz für einen Laborautoklaven in 75 mL trockenen Tetrahydrofuran gelöst. Der Lösung wurden 1.33 g Palladium auf Aktivkohle (10%ig) zugesetzt. Dann wurde der Glaseinsatz in den Laborautoklaven eingesetzt und mit Wasserstoffgas gespült. Anschließend wurde ein Wasserstoffdruck von $7 \cdot 10^5$ Pa aufgebaut und 3 Tage lang im Autoklaven unter Rühren aufrechterhalten.

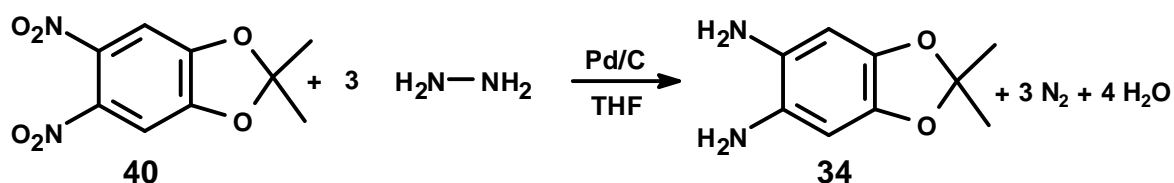
Nach beendeter Reaktion wurde der Reaktor mit Argon gespült und der Katalysator über eine Celite^(T) 545 Säule unter Argon abgetrennt, mit trockenem Ethylacetat nachgespült, das Lösungsmittel abkondensiert und ein grauer Feststoff **34** erhalten.

Ausbeute an **34**: 7.06 g (39.2 mmol; 94%, Lit.^[56] 97%)



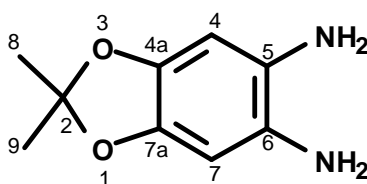
¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ [ppm]= 6.23 (s, 2 H, 4-H, 7-H); 3.10(br, 4 H, NH₂); 1.60 (s, 6 H, 8-H, 9-H)

¹³C-NMR (125 MHz; CDCl₃): δ [ppm]= 140.97 (4a-C, 7a-C); 127.55 (5-C, 6-C); 116.98 (2-C); 99.52 (4-C, 7-C); 25.54 (8-C, 9-C)

7.3.1.5 2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin (Variante 2) ^[50]

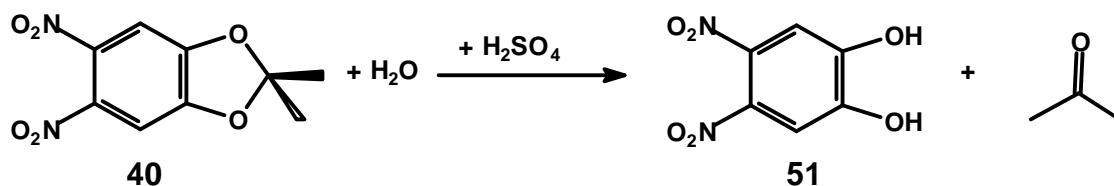
In einem 500-mL-Dreihalskolben mit Tropftrichter und Rückflusskühler mit Blasenzähler wurden 2.04 g (8.50 mmol) 2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-1,3-benzdioxol **40** in 190 mL trockenem Tetrahydrofuran vorgelegt und unter schwachem Argonstrom mit 0.76 g Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt. Unter Rühren wurden 3.80 mL Hydrazinmonohydrat in 38.0 mL Tetrahydrofuran zu der Lösung unter Rückfluss hinzuge tropft und der Fortschritt der Reaktion über die Gasentwicklung beobachtet. Nachdem die Gasentwicklung nach ca. 4 h beendet war, wurde der Katalysator über Celite^(T) 545 in einer D4-Umkehrfritte abgezogen und das Lösungsmittel von der Lösung abkondensiert. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten, der weniger Verunreinigungen enthielt als der nach Variante 1 hergestellte Feststoff **34**.

Ausbeute an **34**: 1.50 g (8.30 mmol; 98%)



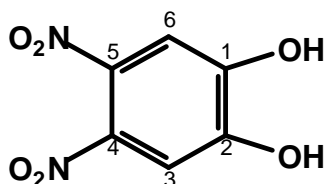
¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ [ppm]= 6.23 (s, 2 H, 4-H, 7-H); 3.10(br, 4 H, NH₂); 1.60 (s, 6 H, 8-H, 9-H)

¹³C-NMR (125 MHz; CDCl₃): δ [ppm]= 140.97 (4a-C, 7a-C); 127.55 (5-C, 6-C); 116.98 (2-C); 99.52 (4-C, 7-C); 25.54 (8-C, 9-C)

7.3.1.6 4,5-Dinitro-benz-1,2-diol^[56]

Zu 23.2 g (96.7 mmol) 2,2-Dimethyl-5,6-dinitro-benzdioxol **40** wurden 50.0 mL 98 %ige Schwefelsäure gegeben und 1 h gerührt. Danach wurde das Gemisch in 500 mL Eiswasser gegeben und weitere 4 h gerührt. Die entstandene Lösung wurde solange mit Ether perforiert bis die wässrige Phase farblos wurde. Anschließend wurde die Etherphase über Magnesiumsulfat getrocknet und der Ether danach entfernt. Das Produkt **51** blieb analysenrein als gelber Feststoff zurück.

Ausbeute an **51**: 17.7 g (88.5 mmol, 92%, Schmp. 168 °C)

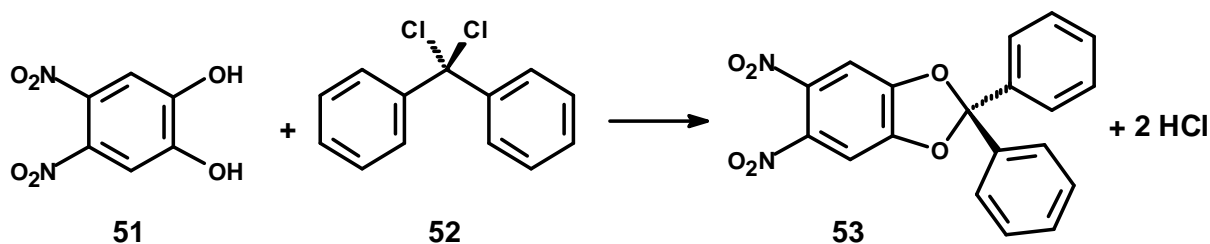


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; DMSO-d_6): δ [ppm] = 7.42 (s, 2 H, 3-H, 6-H); 11.23 (s, 2 H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz; DMSO-d_6): δ [ppm] = 111.63 (3-C, 6-C); 134.99 (4-C, 5-C); 149.80 (1-C, 2-C)

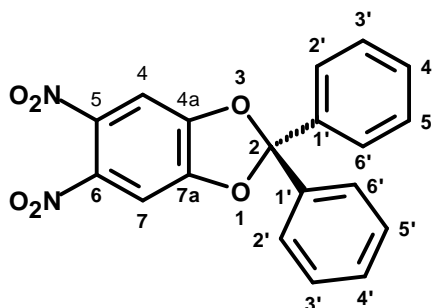
IR (KBr):

ν [cm^{-1}] = 3536, 3325 (w, $\nu(-\text{OH})$), 3070 (m, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 1532 (s, $\nu(-\text{NO}_2)$)

7.3.1.7 5,6-Dinitro-2,2-diphenyl-1,3-benzdioxol^[30, 77]

18.5 g (77.9 mmol) α,α -Dichlordiphenylmethan **52** und 15.6 g (78.2 mmol) 4,5-Dinitrobenz-1,2-diol **51** werden 30 min auf 170 °C erhitzt. Dabei wurde, um entstehendes HCl-Gas zu entfernen, während der Reaktionszeit kontinuierlich Argon über das Reaktionsgemisch geleitet. Der abgekühlte Feststoff wurde mit wenig absolutem Ethanol rekristallisiert, die entstandenen sandgelben Kristalle **53** abfiltriert, mit eiskaltem, absolutem Ethanol gewaschen und im Ölpumpenvakuum über Calciumchlorid getrocknet.

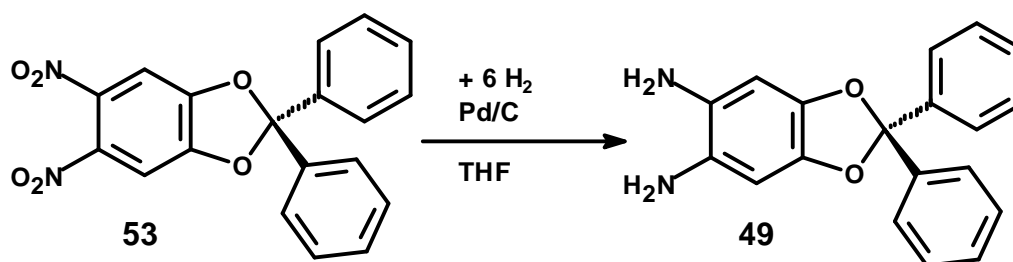
Ausbeute an **53**: 21.3 g (59.0 mmol, 75 % Lit.^[30] 76 %, Schmp. 131°C, Lit.^[30] 132°C)



¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ [ppm]= 7.48–7.51 (m, 4 H, 2'-H, 6'-H); 7.44–7.39 (m, 6 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 7.36 (s, 2 H, 4-H, 7-H)

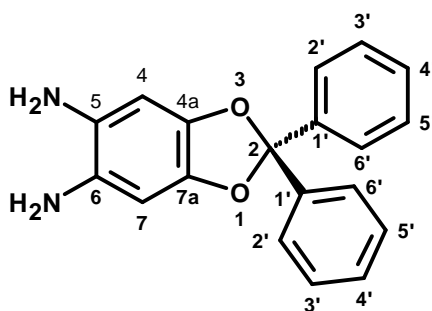
¹³C-NMR (125 MHz; CDCl₃): δ [ppm]= 150.17 (4a-C, 7a-C); 138.80 (5-C, 6-C); 137.71 (1'-C); 130.25 (4'-C); 128.69 (3'-C); 126.09 (2'-C); 122.42 (2-C); 105.16 (4-C, 7-C)

7.3.1.8 2,2-Diphenyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin



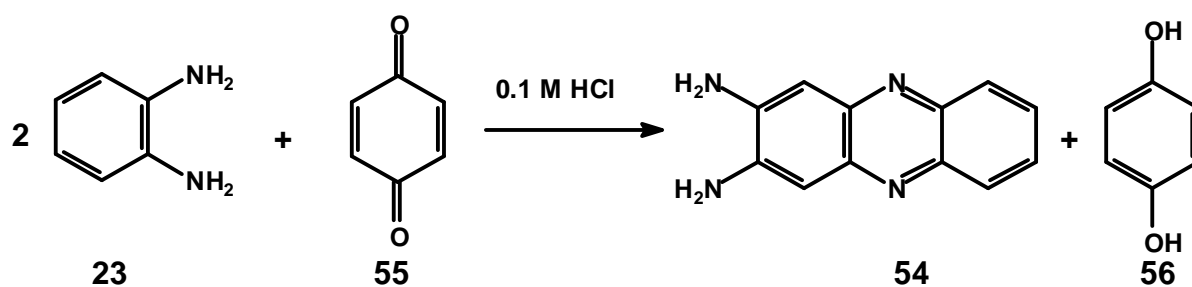
3.17 g (8.70 mmol) 5,6-Dinitro-2,2-diphenyl-1,3-benzdioxol **53** wurden in einem Glaseinsatz für einen Laborautoklaven in 130 mL THF gelöst und 0.20 g Palladium auf Aktivkohle (10 %) hinzugegeben. Danach wurde das Reaktionsgemisch, bei einem Wasserstoffdruck von $7 \cdot 10^5$ Pa und Raumtemperatur, drei Tage in einem Autoklaven gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit Celite 545 filtriert und das THF daraufhin unter Schutzgas abkondensiert. Der zurückbleibende Feststoff war das gewünschte Produkt.

Ausbeute an **49**: 2.04 g (8.67 mmol, 98% Lit.^[30] 100 %)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CDCl_3): δ [ppm]= 7.55 - 7.53 (m, 4 H, 2'-H, 6'-H); 7.35 - 7.29 (m, 6 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 6.36 (s, 2 H, 4-H, 7-H); 3.15 (b, 4 H, NH_2);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz; CDCl_3): δ [ppm]= 140.79 (4a-C, 7a-C); 140.63 (1'-C); 128.85 (5-C, 6-C); 128.25 (3'-C, 5'-C); 128.13 (4'-C); 126.39 (2'-C, 6'-C); 115.91 (2-C); 99.64 (4-C, 7-C)

7.3.1.9 2,3-Phenazindiamin^[66, 67]

In einem 100 mL Erlenmeyer-Kolben mit Magnetrührstab wurden 1.08 g (10.0 mol) 1,2-Phenylendiamin **23** und 1.10 g (10.0 mol) 1,4-Benzochinon **55** mit 50.0 mL einer 0.1 M Salzsäure versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Der hierbei entstandene rote Niederschlag wurde scharf abgesaugt und zunächst mit Ammoniakwasser, dann mit wenig VE-Wasser gewaschen. Der so erhaltene Feststoff **54** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und per ^1H -NMR und Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat/Toluol 9:1 auf Kieselgel $R_f = 0.14$) auf Reinheit überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass noch 1,4-Benzochinon **55** in dem Feststoff vorhanden war. Daher wurde der Feststoff in 5.0 mL 38-40 % NaHSO_3 Lösung aufgenommen um das Chinon **55** zum Hydrochinon **56** zu reduzieren, des Weiteren wurde in 20 % Natronlauge gerührt und der resultierende Rückstand abfiltriert und im Exsikkator über Calciumchlorid getrocknet.

Ausbeute an **54**: 1.00 g (4.90 mmol, 98 %; Lit.^[67] 100%)

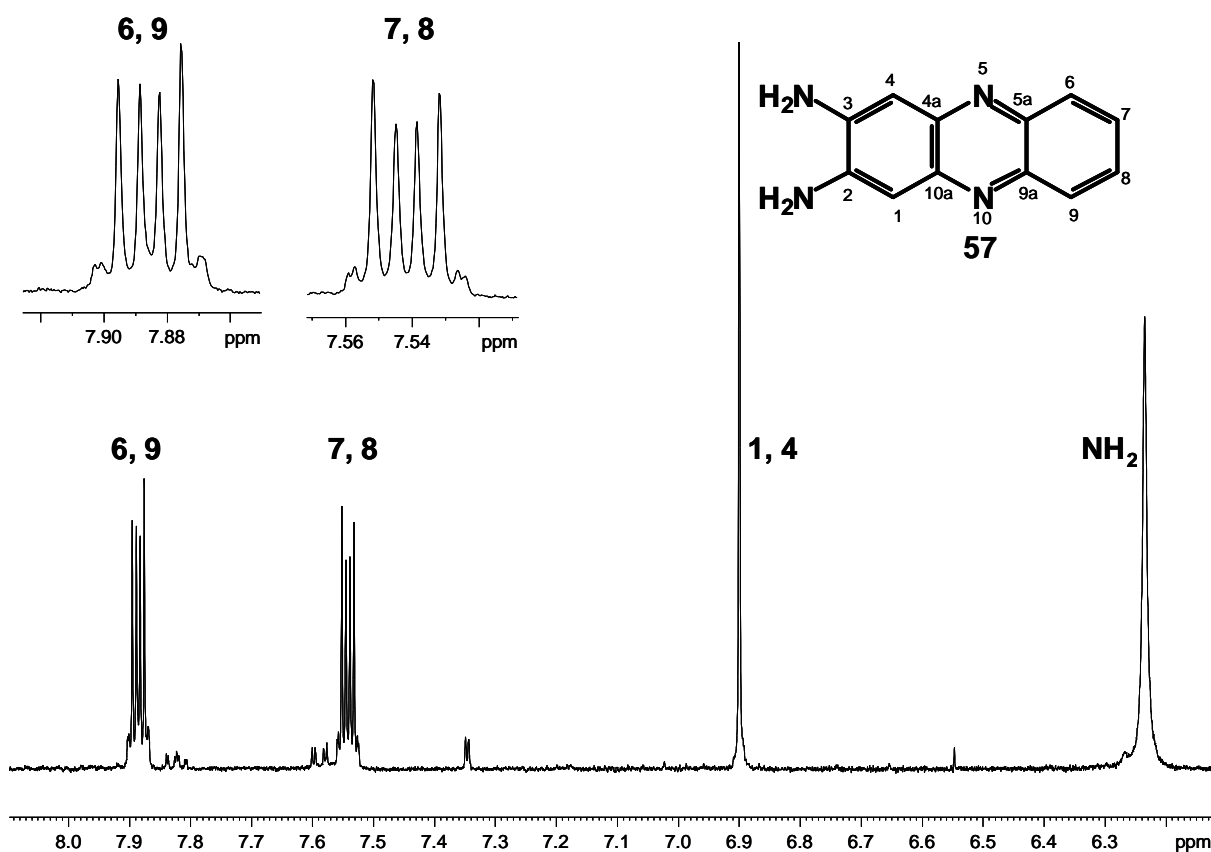


Abb. 62: ^1H -NMR von 57 in DMSO-d_6 (enthält noch das Hydrochlorid von 57)

^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6): $\delta[\text{ppm}] = 7.88$ (m, 2 H, 6-H, 9-H), 7.54 (m, 2 H, 7-H, 8-H), 6.90 (s, 2 H; 1-H, 4-H), 6.23 (s, 4 H, NH_2)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, DMSO-d_6): $\delta[\text{ppm}] = 144.04$ (4a-C, 10a-C), 142.04 (5a-C, 9a-C), 140.29 (2-C, 3-C), 127.87 (1-C, 4-C), 126.40 (2-C, 9-C), 102.17 (7-C, 8-C)

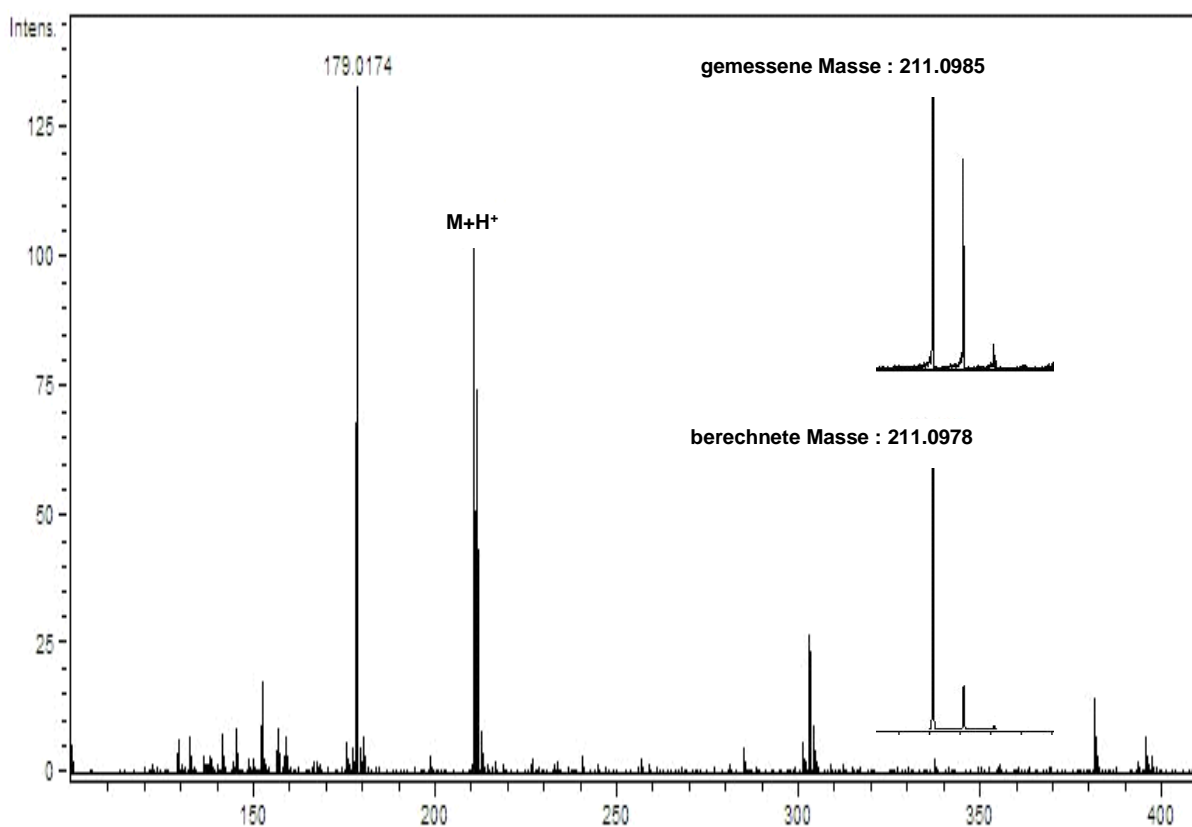
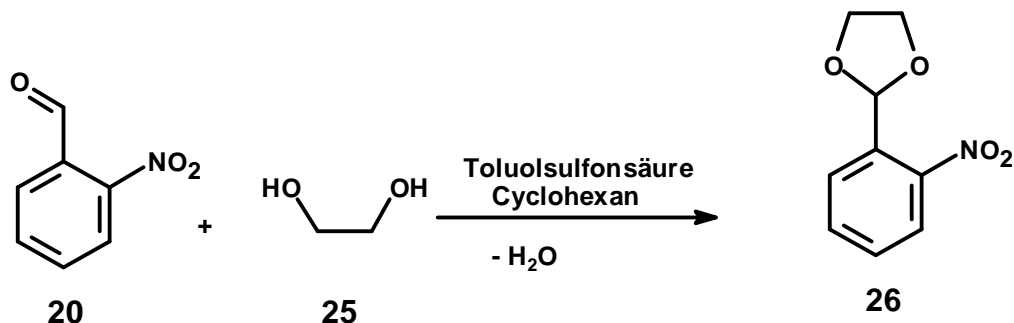


Abb. 63: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von 54

berechnet (für $C_{12}H_{11}N_4$ 54):	211.0978	$[M + H^+]$
gefunden :	211.0985	
Abweichung :	3.32 ppm	

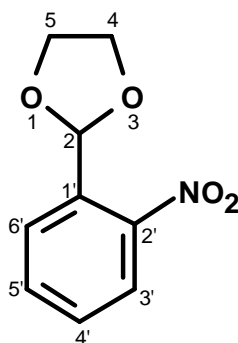
7.3.2 Synthese der Aldehyde

7.3.2.1 2-(2'-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (Analog Lit.^[49])



In einem 250-mL-Kolben werden 7.56 g (50.0 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **20**, 3.42 g (55.0 mmol) Ethylenglycol **25**, 0.40 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat und 90 mL Cyclohexan eingefüllt und über Nacht an einem Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt. Die heiße Cyclohexan - Lösung wurde von dem schwarzen Öl abdekantiert und in einem Erlenmeyerkolben abgekühlt. Dabei setzte sich ein gelbes Öl am Boden ab. Dieses Öl wurde in einem Scheidetrichter zweimal mit je 25 mL einer 10%igen Natriumcarbonat – Lösung und anschließend zweimal mit 25 mL VE-Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zweimal mit Dichlormethan gereinigt und die vereinigten organischen Phasen über Calciumchlorid getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Hierbei wurde ein hellgelbes Öl **26** erhalten. Im ¹H-NMR war keinerlei Verunreinigung zu sehen.

Ausbeute an **26**: 7.06 g (42.7 mmol; 85 %)

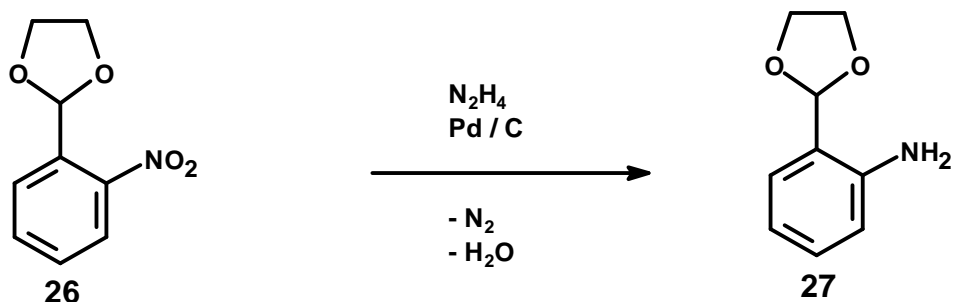


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 7.78$ (dd, $^3J\{6'\text{-H}, 5'\text{-H}\} = 8.07 \text{ Hz}$; $^4J\{6'\text{-H}, 2\text{-H}\} = 1.24 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H); 7.76 (d, $^3J\{3'\text{-H}, 4'\text{-H}\} = 7.75 \text{ Hz}$; 1H, 3'-H); 7.53 (dt, $^3J\{4'\text{-H}, 3'\text{-H}\} = 7.75 \text{ Hz}$; $^3J\{4'\text{-H}, 5'\text{-H}\} = 7.54 \text{ Hz}$, 1H, 4'-H); 7.40 (dt, $^3J\{5'\text{-H}, 4'\text{-H}\} = 7.54 \text{ Hz}$; $^3J\{5'\text{-H}, 6'\text{-H}\} = 8.07 \text{ Hz}$, 1H, 5'-H); 6.37 (d, $^4J\{2\text{-H}, 6'\text{-H}\} = 1.24 \text{ Hz}$, 1H, 2-H); 3.92 (m, 4H, 4-H, 5-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 148.48$ (2'-C); 132.84 (1'-C); 132.61 (5'-C); 129.38 (4'-C); 127.31 (6'-C); 124.02 (3'-C); 99.20 (2-C); 64.97 (4-C, 5-C)

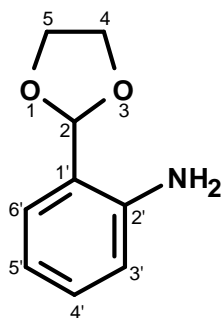
IR (KBr):

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3079$ (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 2959, 2890 (m, $\nu(\text{CH}_{\text{aliph.}})$), 1530, 1354 (s, $\nu(\text{NO}_2)$), 1200, 1107, 1070 ((m, $\nu(\text{C-O})$))

7.3.2.2 2-(2'-Aminophenyl)-1,3-dioxolan^[50]

In einem 500-mL-Dreihalskolben wurden 4.34 g (22.2 mmol) 2-(2'-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan **26** in 250 mL Ethanol p.a. vorgelegt und unter leichtem Schutzgasstrom wurde 1.00 g Palladium auf Aktivkohle (10%ig) hinzugefügt. Unter Rühren wurden langsam 5 mL Hydrazinmonohydrat in 50 mL Ethanol bei Raumtemperatur zugetropft. Die Reaktion wurde über die Stickstoffentwicklung mittels Blasenähler auf ihren Fortschritt hin überprüft. Nach 4 h war keine Gasentwicklung mehr sichtbar, so dass die Reaktion beendet wurde, indem der Katalysator über Celite^(T) 545 in einer D4-Fritte abgetrennt wurde. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und ein strohgelbes Öl **27** erhalten, dass im Ölpumpenvakuum destilliert werden konnte.

Ausbeute an **27**: 3.20 g (19.4 mmol; 87 %, Sdp. _{2 hPa} 80°C, Lit.^[78] Sdp. _{4 hPa} 81-82°C)

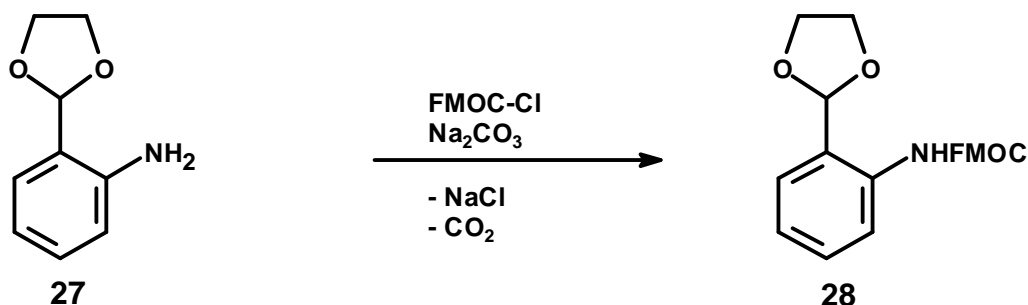


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 7.30$ (dd, $^3J(6'\text{-H}, 5'\text{-H}) = 7.67 \text{ Hz}$; $^4J(6'\text{-H}, 2\text{-H}) = 1.12 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H); 7.29 (dt, $^3J(5'\text{-H}, 6'\text{-H}) = 7.67 \text{ Hz}$; $^3J(5'\text{-H}, 4'\text{-H}) = 7.57 \text{ Hz}$, 1H, 5'-H); 6.74 (dt, $^3J(4'\text{-H}, 5'\text{-H}) = 7.57 \text{ Hz}$, $^3J(4'\text{-H}, 3'\text{-H}) = 8.04 \text{ Hz}$, 1H, 4'-C); 6.66 (dd, $^3J(3'\text{-H}, 4'\text{-H}) = 8.04 \text{ Hz}$, 1H, 3'-H); 5.80 (d, $^4J(2\text{-H}, 6'\text{-H}) = 1.12 \text{ Hz}$, 1H, 2-H); 4.05 (m, 4H, 4-H, 5-H); 4.05 (br, 2H, NH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 145.16$ (2'-C); 129.85 (6'-C); 127.36 (4'-C); 121.12 (1'-C); 117.78 (5'-C); 116.33 (3'-C); 103.20 (2-C); 64.70 (4-C, 5-C)

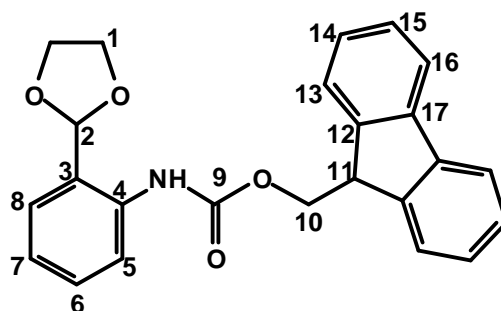
IR (KBr):

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3377, 3360$ (s, $\nu(\text{NH}_2)$), 3013 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), $2933, 2872$ (m, $\nu(\text{CH}_{\text{aliph.}})$), 1624 (s, $\nu(\text{NH}_2)$), $1264, 1084, 1042$ (m, $\nu(\text{C-O})$)

7.3.2.3 2-(2'-N-FMOC-aminophenyl)-1,3-dioxolan (Analog Lit.^[51])

Zu einer Lösung von 1.33 g (5.14 mmol) 9-Fluorenylmethyl-chlorformiat in 4.00 mL trockenem THF wurde unter Eiskühlung langsam eine Lösung von 1.20 g (7.26 mmol) 2-(2'-Aminophenyl)-1,3-dioxolan **27** in 2.60 mL trockenem THF zugetropft. Die anfangs orange Lösung färbte sich nach einiger Zeit rot. Die Lösung wurde mit einer 10%igen Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert und dreimal mit je 10 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde zweimal mit 10%iger Natriumcarbonat-Lösung und anschließend zweimal mit VE-Wasser extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereint und zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und eingengt. Das Produkt war ein rotbraunes, zähflüssiges Öl **28**.

Ausbeute an **28**: 1.90 g (4.90 mmol; 95 %)



¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ[ppm]=11.30 (br, 1H, NH), 7.90-7.60 (m; 5 H; 2-H,5-H, 6-H, 7-H, 8-H); 7.10-7.50 (m; 8 H; 13-H, 14-H, 15-H, 16-H); 4.30-4.70 (m, 3H, 11-H, 10-H), 4.05 (4 H, 1-H)

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 195.3 (2-C), 153.6 (9-C), 143.8 (12-C), 141.4 (17-C), 141.1 (4-C), 136.2 (6-C), 136.1 (8-C), 127.9 (15-C), 127.3 (14-C), 125.3 (13-C), 122.2 (7-C), 121.5 (3-C), 120.1 (16-C), 118.5 (5-C) 67.7 (10-C), 64.7 (1-C), 47.0 (11-C)

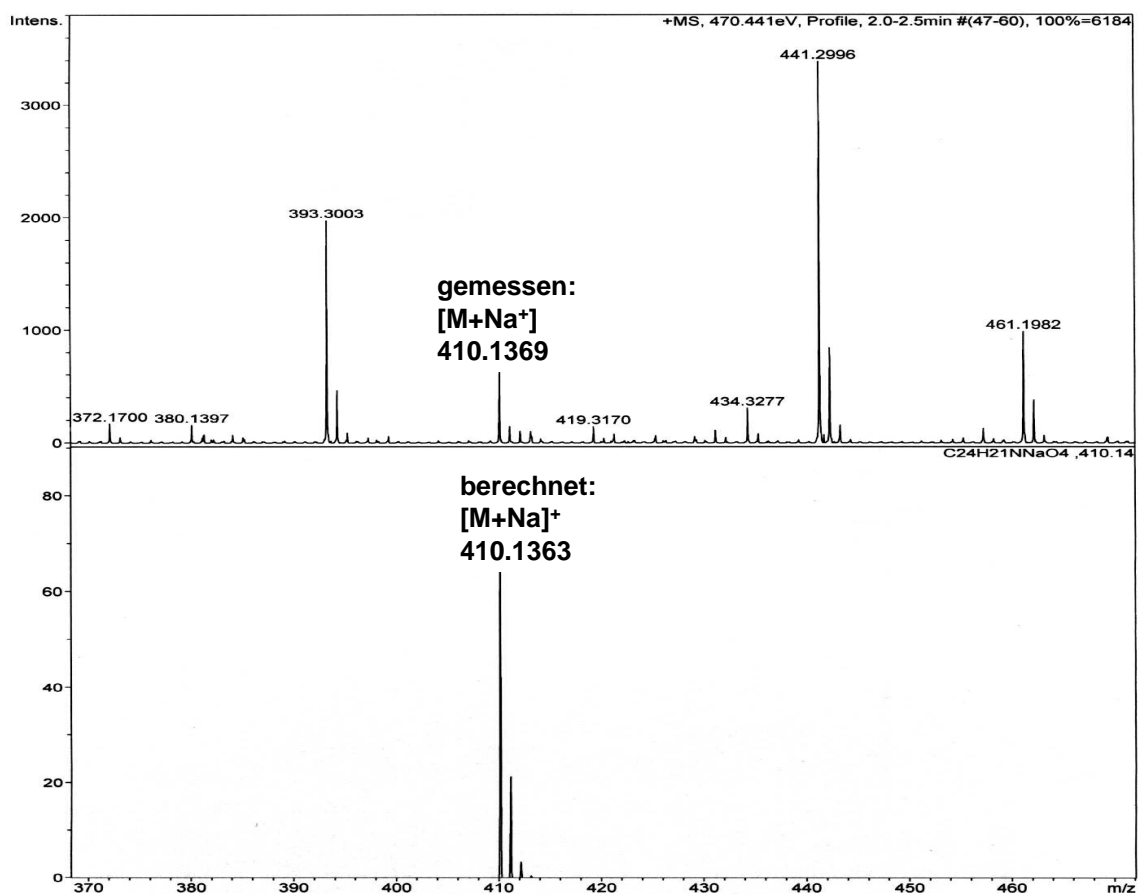
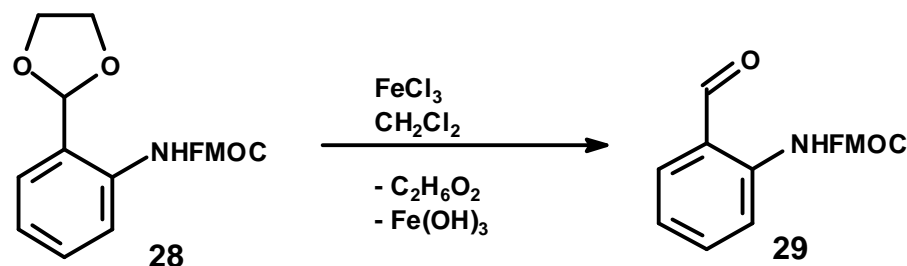
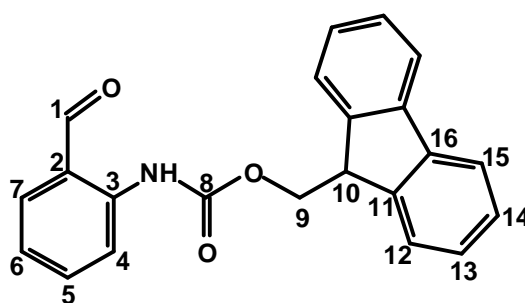


Abb. 64: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von 28

berechnet (für $C_{24}H_{21}NO_4Na$ 28):	410.1363	$[M + Na^+]$
gefunden :	410.1369	
Abweichung :	1.46 ppm	

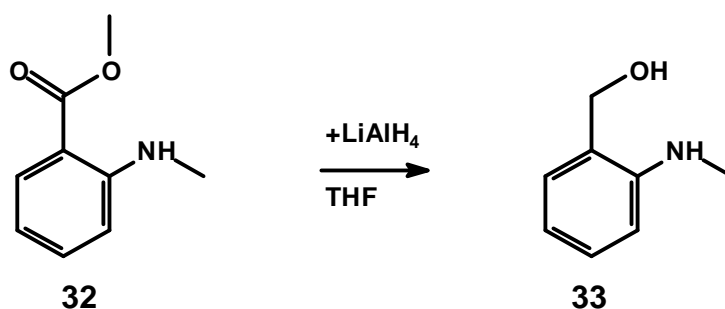
7.3.2.4 N-FMOC-2-aminobenzaldehyd (Analog Lit.^[52])

In einem 500 mL Einhalskolben wurden 6.30 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ und 3.22 g (8.30 mmol) (2'-N-FMOC-aminophenyl)-1,3-dioxolan **28** in 400 mL Dichlormethan 20 min unter Rückfluss gekocht. Die heiße, gelbe Reaktionsmischung wurde in einem 1 L Becherglas zu einer kalt gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben. Hierbei trat Kohlenstoffdioxid aus der Lösung aus und es entstand ein brauner $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}_2(\text{CO}_3)_3$ Niederschlag. Dieser wurde abgesaugt und das Filtrat eingeeengt. Das zurückbleibende gelbe Öl **29** wurde NMR-spektroskopisch untersucht. Es enthielt sowohl freies 1,2-Ethandiol **25** als auch den gewünschten N-FMOC-2-aminobenzaldehyd. Dieses Rohprodukt wurde in der Ligand-Synthese mit 1,2-Phenylendiamin **21** umgesetzt.



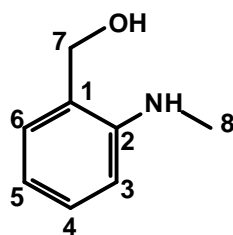
^1H -NMR (500 MHz; CDCl_3): δ [ppm]=11.30 (br, 1 H, NH), 9.96 (s, 1H, 1-H), 8.46 (d, 1 H, 4-H), 7.78 (d, 2 H, 15-H), 7.65 – 7.72 (m, 3 H, 7-H, 12-H), 7.62 (d, 1H, 5-H), 7.43 (m, 2 H, 14-H); 7.35 (dt, 2 H, 13-H), 7.20 (dt, 1 H, 6-H), 4.47 (d, 2 H, 9-H), 4.33 (t, 1 H, 10-H)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ = 195.3 (1-C), 153.6 (8-C), 143.8 (11-C), 141.4 (16-C), 141.1 (3-C), 136.2 (5-C), 136.1 (7-C), 127.9 (14-C), 127.3 (13-C), 125.3 (12-C), 122.2 (6-C), 121.5 (2-C), 120.1 (15-C), 118.5 (4-C) 67.7 (9-C), 47.0 (10-C)

7.3.2.5 2-(Methylamino)-benzylalkohol (Analog Lit.^[47])

In einer ausgeheizten Reaktionsapparatur, bestehend aus einem 1 L-Dreihalskolben mit Magnetrührstab, Schwanzhahn, 250 mL-Tropftrichter und Rückflusskühler mit Überdruckausgleich, wurden unter Schutzgas 33.0 g (0.20 mol) N-Methylantranilsäuremethylester **32** in 400 mL trockenem THF vorgelegt. Der Tropftrichter wurde mit einer Suspension von 5.31 g (0.14 mol) LiAlH_4 in 160 mL trockenem THF befüllt. Die vorgelegte Lösung wurde im Eisbad gekühlt und unter Rühren langsam mit der Suspension versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 90 min unter Eiskühlung nachgerührt. Dann wurde zu der Reaktionsmischung unter Rühren sehr langsam zunächst 10 mL VE-Wasser, dann 10 mL 15%ige NaOH und schließlich 20 mL VE-Wasser hinzugegeben. Nach der letzten Zugabe wurde noch 30 min nachgerührt, der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit etwas THF nachgewaschen. Das Filtrat wurde über Kaliumcarbonat getrocknet, das Trockenmittel abgesaugt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum fraktionierend destilliert (Sdp. $_{2\text{hPa}}$ 95-105°C). Das Produkt **33** war eine gelbe Flüssigkeit.

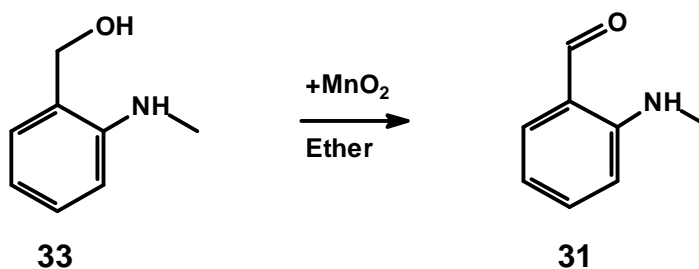
Ausbeute an **33**: 21.2 g (0.15 mol; 77 %)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 7.31$ (dt; $^3J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 7.35 \text{ Hz}$; $^3J\{5\text{-H}, 4\text{-H}\} = 5.52 \text{ Hz}$; $^4J\{5\text{-H}, 3\text{-H}\} = 1.61 \text{ Hz}$; 1H, 5-H); 7.10 (dd; $^3J\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 7.64 \text{ Hz}$; $^4J\{5\text{-H}, 3\text{-H}\} = 1.61 \text{ Hz}$; 1H; 3-H); $6.70\text{-}6.80$ (m; 2 H; 6-H, 4-H); 4.67 (s, 2 H, 7-H), $3.30\text{-}2.94$ (br, 2H, NH+OH); 2.91 (s, 3 H, 8-H)

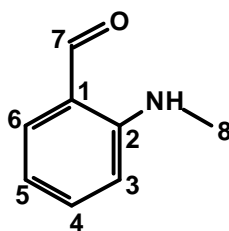
IR (KBr):

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3594$ (s, ν (NH)), 3420 (s, ν (OH)), 3018 (w, ν ($\text{CH}_{\text{arom.}}$)), 2930 , 2870 (m, ν ($\text{CH}_{\text{aliph.}}$)), 1598 (s, ν (NH)), 1519 (m, ν ($\text{C-C}_{\text{arom.}}$))

7.3.2.6 2-(Methylamino)-benzaldehyd^[47]

In einem 1 L-Dreihalskolben mit KPG-Rührer und Rückflusskühler wurden 21.2 g (154 mmol) 2-(Methylamino)-benzylalkohol **33** in 500 mL Diethylether vorgelegt. Unter kräftigem Rühren wurden langsam 130.0 g (1.50 mol) Mangandioxid Typ A^[53] hinzugegeben und weitere 6 h gerührt. Nach der Reaktion wurde der Feststoff abfiltriert und dreimal mit je 20.0 mL Diethylether und dann dreimal mit heißem Chloroform gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und mit MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Trockenmittels wurde fraktioniert destilliert (Sdp._{22 hPa} 126°C, Lit.^[47] Sdp._{13 hPa} 112°C). Das Produkt **31** war eine gelbe Flüssigkeit.

Ausbeute an **31**: 13.40 g (98.0 mmol; 63 % Lit.^[47] 51 %)

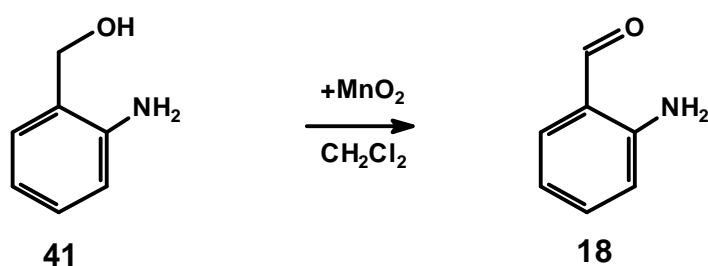


¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ[ppm]= 9.65 (d; ⁴J{7-H, 6-H}= 0.50 Hz; 1H, 7-H); 8.20 (br, 1H, NH), 7.28 (dd; 1H, 3-H); 7.25 (t; 1H; 5-H); 7.20 (dt; 1 H; 6-H); 6.50 (q; 1 H; 4-H); 2.90 (s, 3H, 8-H)

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ[ppm]= 194.02 (7-C); 152.11 (2-C); 136.70 (6-C); 134.74 (4-C); 118.53 (1-C); 114.83 (5-C); 110.82 (3-C), 29.65 (8-C)

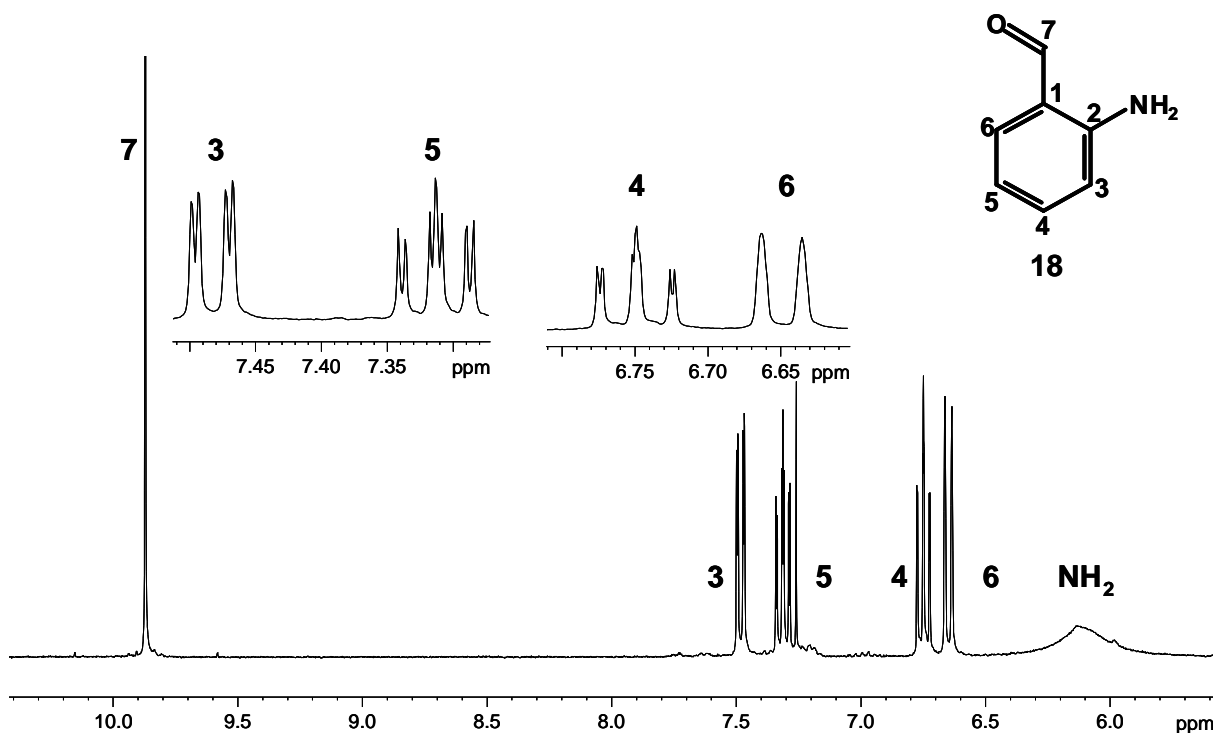
IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3454, 3374 (s, ν(NH)), 3065, 3005 (w, ν(CH_{arom.})), 2985, 2895, 2865 (m, ν(CH_{aliph.})), 1665 (s, ν(C=O)), 1257, 1087, 1033 (m, ν(C-O))

7.3.2.7 2-Aminobenzaldehyd^[59]

Eine Lösung von 12.5 g (100 mmol) 2-Aminobenzylalkohol **41** in 250 mL trockenem Dichlormethan wurde unter Argon vorsichtig zu einer Suspension von 35.0 g (161 mmol) Mangandioxid Typ A^[53] in 250 mL trockenem Dichlormethan getropft. Anschließend wurde die Suspension 15 h bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt und der Feststoff über Celite 545 abfiltriert. Der Feststoff wurde dreimal mit je 40 mL Dichlormethan nachgewaschen und die vereinten organischen Phasen auf wenige Milliliter eingengt. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung mit Dichlormethan über eine mit 100 g Kieselgel 60 Å gefüllte Säule mit D4-Fritte und ca. 8 cm Durchmesser. Die komplette erste gelbe Fraktion wurde gesammelt das Lösungsmittel abkondensiert und das Produkt **18** zur Vermeidung einer Polykondensation auf Trockeneis gelagert.

Ausbeute an **18**: 5.81 g (48.0 mmol; 48 % Lit.^[59] 86 %; Schmp. 37°C; Lit.^[59] 38 °C)

Abb. 65: ^1H -NMR von **18** in CDCl_3

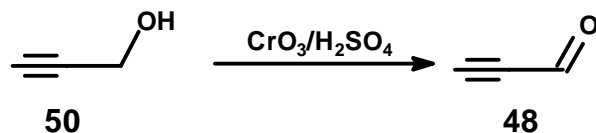
^1H -NMR (500 MHz; CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 9.87$ (d; $^4J\{7\text{-H}, 6\text{-H}\} = 0.50$ Hz; 1H, 7-H); 7.48 (d; $^3J\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 7.80$ Hz; 1H, 3-H); 7.31 (dt; $^3J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 8.31$ Hz; $^3J\{5\text{-H}, 4\text{-H}\} = 7.15$ Hz; 1H, 5-H); 6.75 (dt; $^3J\{4\text{-H}, 5\text{-H}\} = 7.15$ Hz; $^3J\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 7.80$ Hz; 1H, 4-H); 6.65 (dd; $^3J\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.31$ Hz; $^4J\{6\text{-H}, 7\text{-H}\} = 0.50$ Hz; 1H, 6-H); 6.10 (br, 2H, NH_2)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 194.16$ (7-C); 148.98 (2-C); 135.77 (6-C); 135.25 (3-C); 118.83 (1-C); 116.37 (5-C); 116.07 (4-C)

IR (KBr):

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3454, 3374$ (s, $\nu(\text{NH}_2)$), 3065, 3005 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 2985, 2895, 2865 (m, $\nu(\text{CH}_{\text{aliph.}})$), 1665 (s, $\nu(\text{C=O})$), 1257, 1087, 1033 (m, $\nu(\text{C-O})$)

7.3.2.8 Propinal^[65]



Ein Vierhals-Rundkolben wurde mit KPG-Rührer, Thermometer, Tropftrichter, Kapillare zum Einleiten von Stickstoff nahe dem Kolbenboden, Ausleitrohr für das entweichende Produkt und Manometer ausgestattet. Die entweichenden Gase wurden in vier hintereinander geschalteten Waschflaschen aufgefangen. Reaktionskolben und die erste Waschflasche wurden mit einer Eis/Kochsalz-Mischung auf $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, die anderen Waschflaschen mit Aceton/Trockeneis auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt.

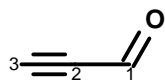
112.0 g (2.00 mol) Propinol **50** wurden unter Eiskühlung und Rühren zu 240 mL Eiswasser gegeben. Dazu wurden langsam innerhalb von 30 min 135 mL konzentrierte Schwefelsäure in 200 mL Wasser gegeben, wobei die Temperatur bei $0\text{--}5^{\circ}\text{C}$ gehalten wurde. Danach wurde Stickstoff über die Kapillare eingeleitet und der Druck mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe auf $70 \cdot 10^3\text{ Pa}$ eingestellt. Unter starkem Rühren und anhaltendem Stickstoffstrom wurden innerhalb von 3 h 219 g (2.19 mol) Chromtrioxid in 400 mL 98 %iger Schwefelsäure und 120 mL Wasser zugetropft. Dabei wurde die Reaktionstemperatur durch Eiskühlung unter 10°C gehalten.

Danach ließ man das Reaktionsgemisch durch Entfernen der Eiskühlung auf Raumtemperatur erwärmen und rührte noch weitere 90 min nach.

Das entstehende Propinal **48** wurde in den hintereinander geschalteten Kühlfallen kondensiert. Anschließend wurden die in den Kühlfallen aufgefangenen, roten Kondensate über eine 20 cm lange Vigreux – Kolonne bei Normaldruck fraktionierend destilliert. Die Produktfraktion hatte einen Siedebereich von $54\text{--}57^{\circ}\text{C}$ (Lit. $55\text{--}57^{\circ}\text{C}$ ^[65]).

Ausbeute an **48**: 38.4 g (0.68 mol, 34 %, Lit.^[65] 35-41%)

Charakterisierung des Produktes:

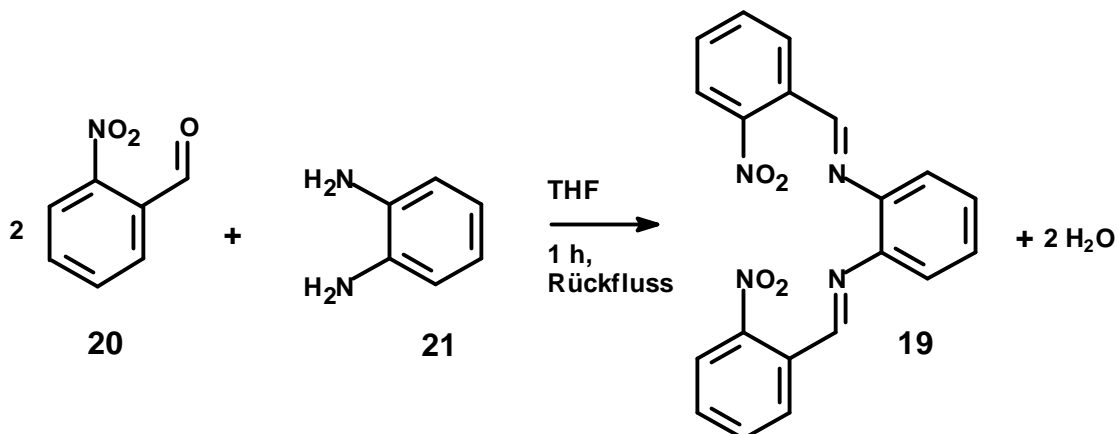


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 9.17$ (s, 1H, 1-H); 3.52 (s, 1H, 3-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 178.58$ (1-C); 82.93 (2-C); 81.34 (3-C)

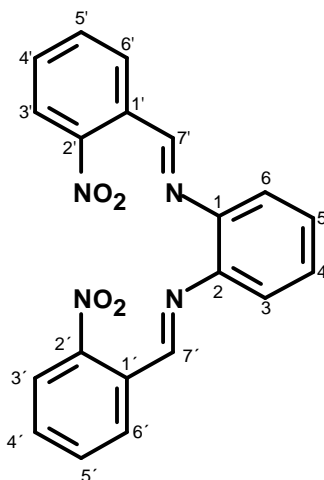
7.3.3 Templat - Synthesen

7.3.3.1 N,N'-Bis(2'-nitrobenzyliden)-1,2-phenylendiamin (Analog Lit.^[79])^[34]



In einem 500-mL-Zweihalskolben mit Schwanzhahn wurden 30.2 g (0.20 mol) 2-Nitrobenzaldehyd **20** eingewogen und unter Schutzgas in 160 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Unter starkem Rühren wurden portionsweise 10.8 g (0.10 mol) frisch sublimiertes 1,2-Phenylendiamin **21** hinzugefügt, wobei sich die zuvor gelbe Lösung tiefrot färbte. Die Lösung wurde noch 1 h unter Rückfluss gekocht, anschließend am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockene eingeeengt. Der dabei erhaltene rote Feststoff wurde in Chloroform gelöst und auf 500 mL Ethanol geschüttet. Der dabei ausgefallene orange Feststoff wurde abgesaugt und mit etwas kaltem Ethanol nachgewaschen. Der Feststoff wurde über Phosphor(V)-oxid getrocknet und aus Cyclohexan p.a. umkristallisiert. Der in der Kälte ausgefallene Feststoff **19** wurde wiederum scharf abgesaugt und über Paraffin getrocknet. Der Feststoff **19** enthielt noch geringe Mengen (ca. 4 %) Edukt, das bei 80°C im Ölpumpenvakuum aus dem 2-Nitrobenzaldehyd **20** heraussublimiert wurde.

Ausbeute an **19**: 32.0 g (0.08 mol, 80 %, Lit.^[34] 80 %, Schmp. 205°C, Lit.^[34] 205°C)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; DMSO-d_6): $\delta[\text{ppm}] = 8.80$ (s, 2 H, 7'-H); 8.17 (dd, $^3J\{5'\text{-H}, 4'\text{-H}\} = 7.69 \text{ Hz}$; $^3J\{6'\text{-H}, 5'\text{-H}\} = 7.53 \text{ Hz}$, 4 H, 5'-H, 6'-H); 7.86 – 7.76 (m, 4 H, 4'-H, 4-H, 5-H); 7.37 (d, $^3J\{3\text{-H}, 4\text{-H}\} = ^3J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 9.36 \text{ Hz}$; 2 H, 3-H, 6-H); 7.26 (d, $^3J\{3'\text{-H}, 4'\text{-H}\} = 9.32 \text{ Hz}$, 2 H, 3'-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 158.63$ (7'-C); 151.78 (2'-C); 148.86 (1-C, 2-C); 133.23 (4-C, 5-C); 132.61 (5'-C); 132.13 (6'-C); 127.79 (1'-C); 124.76 (4'-C); 118.91 (3-C, 6-C); 117.17 (3'-C)

IR (KBr):

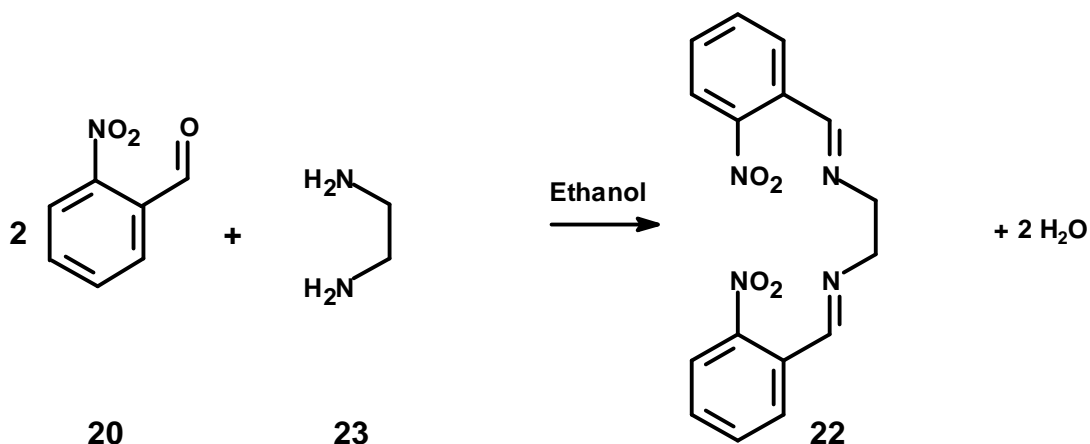
$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3053$ (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 2925 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{aliph.}})$), 2650 (m, $\nu(\text{C=NH}^+)$), 1611 (w, $\nu(\text{C=N})$), 1527, 1346 (s, $\nu(\text{NO}_2)$)

Elementaranalyse: $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$ [374.4]

ber. C 64.17 % H 3.77 % N 14.97 %

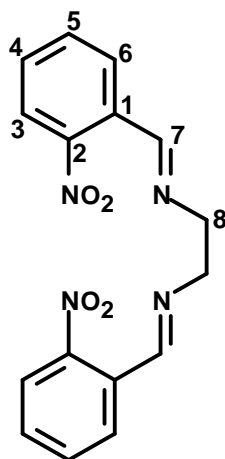
gef. C 64.30 % H 3.85 % N 14.65 %

MS (ESI, positiver Ionenmodus, Direkteinlass, 7 μM in Acetonitril): m/z : 375 $[\text{M}+\text{H}^+]$

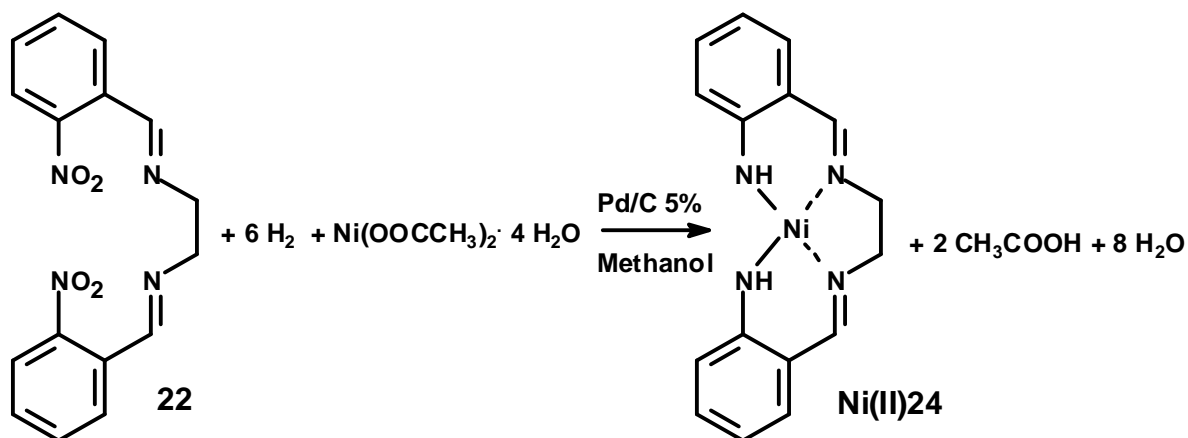
7.3.3.2 N,N'-Bis(2'-nitrobenzyliden)-1,2-ethyldiamin^[47]

Eine Lösung von 2.06 g (13.6 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **20** und 0.45 mL (0.40 g; 6.66 mmol) 1,2-Ethyldiamin **23** in 20.0 mL Ethanol p.a. wurde in einem 50 mL-Einhalskolben 30 min unter Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen der Lösung kristallisierte ein gelber Feststoff aus. Dieser wurde scharf abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert und es entstanden hellgelbe Nadeln **22**.

Ausbeute an **22**: 2.01 g (6.16 mmol; 93 %; Lit.^[47] 89 %, Schmp. 109°C Lit.^[47] 110-112°C)



¹H-NMR (200 MHz; DMSO-d₆): δ [ppm]= 8.80 (s, 2 H, 7-H); 8.17 (dd, 4 H, 5-H, 6-H); 7.86 – 7.76 (m, 2 H, 4-H); 7.26 (d, 2 H, 3-H), 2.78 (t, 4 H, 8-H)

7.3.3.3 N,N'-1,2-Ethylen-bis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II)^[47]

In einem 100 mL-Zweihalskolben mit Schwanzhahn wurde unter Schutzgas eine Lösung von 1.50 g (4.60 mmol) N,N'-Bis(2'-nitrobenzyliden)-1,2-ethylen-diamin **22** und 2.39 g (9.60 mmol) Nickelacetat-tetrahydrat in 50 mL Methanol p.a. mit 0.10 g Palladium auf Aktivkohle (5 %) versetzt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur und Normaldruck gerührt und über eine Hydrierungsapparatur über Nacht mit elementarem Wasserstoff versetzt. Der Katalysator wurde über Celite 545 unter Schutzgas abgesaugt und dreimal mit je 10 mL heißem DMF nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer vollständig entfernt und der rotbraune Feststoff **Ni(II)24** aus DMF umkristallisiert und der so erhaltene Feststoff **Ni(II)24** im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **Ni(II)24**: 1.20 g (3.71 mmol; 81 %; Lit.^[47] 69 %, Schmp. 320°C)

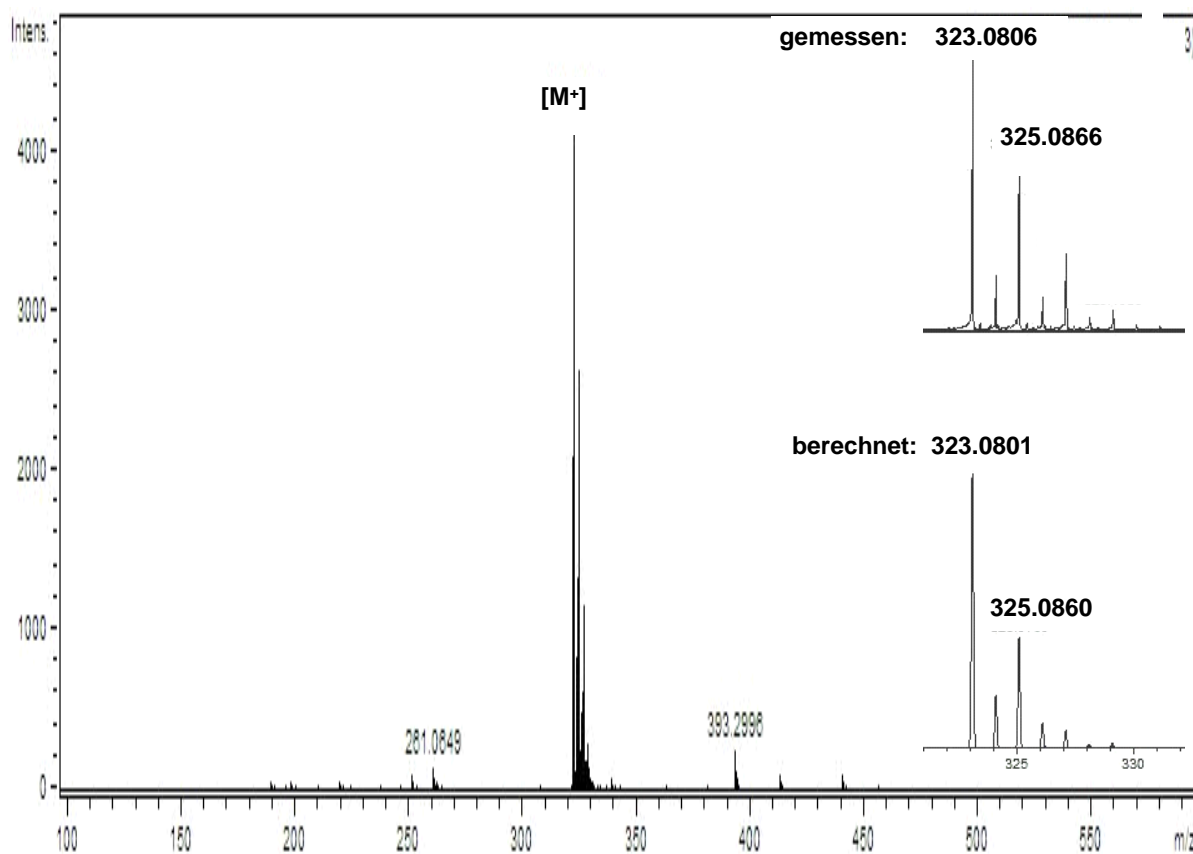
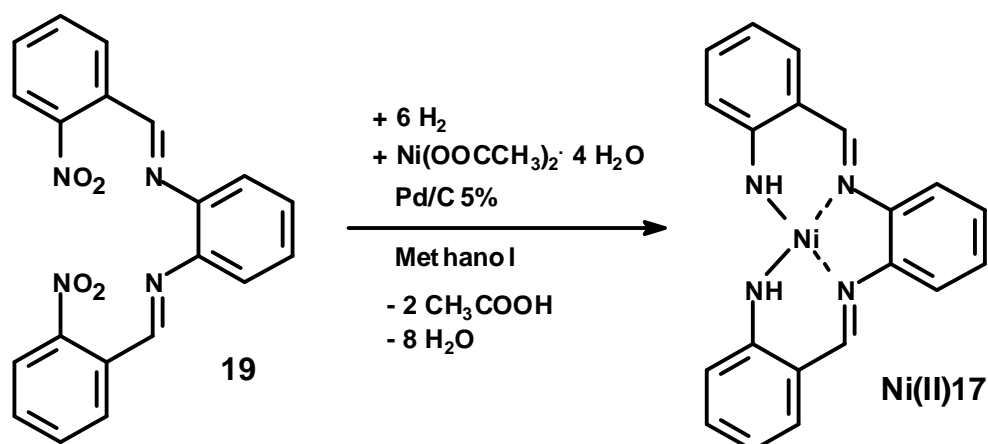


Abb. 66: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von Ni(II)24

berechnet (für C ₁₆ H ₁₆ N ₄ Ni Ni(II)24):	323.0806	[M ⁺]
gefunden :	323.0801	
Abweichung :	1.55 ppm	

7.3.3.4 N,N'-1,2-Phenylenebis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II) (Analog Lit. [48])

In einem 100 mL-Zweihalskolben mit Schwanzhahn wurde unter Schutzgas eine Lösung von 1.77 g (4.60 mmol) N,N'-Bis(2'-nitrobenzyliden)-1,2-phenyldiamin **19** und 2.39 g (9.60 mmol) Nickelacetattetrahydrat in 50.0 mL Methanol p.a. mit 0.10 g Palladium auf Aktivkohle (5 %) versetzt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur und Normaldruck gerührt und über eine Hydrierungsapparatur über Nacht mit elementarem Wasserstoff versetzt. Der Katalysator wurde über Celite 545 unter Schutzgas abgesaugt und dreimal mit je 10.0 mL heißem DMF nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer vollständig entfernt und der rotbraune Feststoff **Ni(II)17** aus THF umkristallisiert und der so erhaltene Feststoff **Ni(II)17** im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **Ni(II)17**: 1.35 g (3.64 mmol; 78 %, Schmp. 350°C)

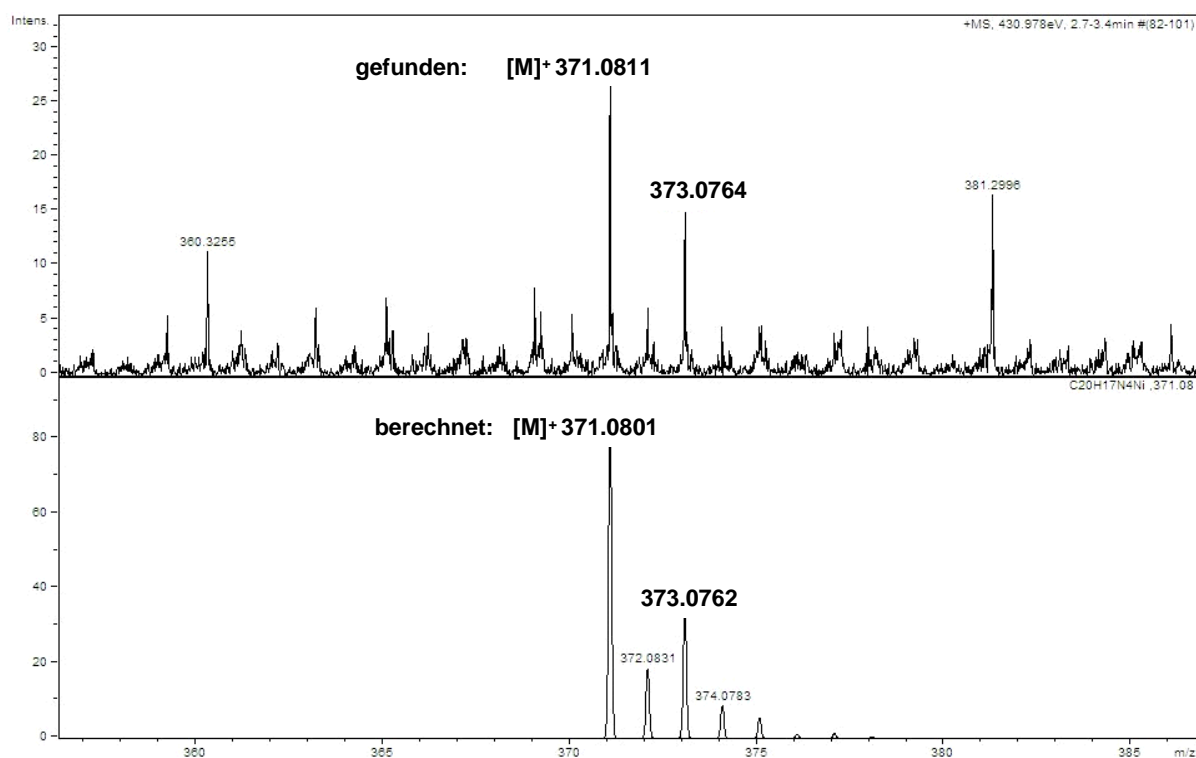
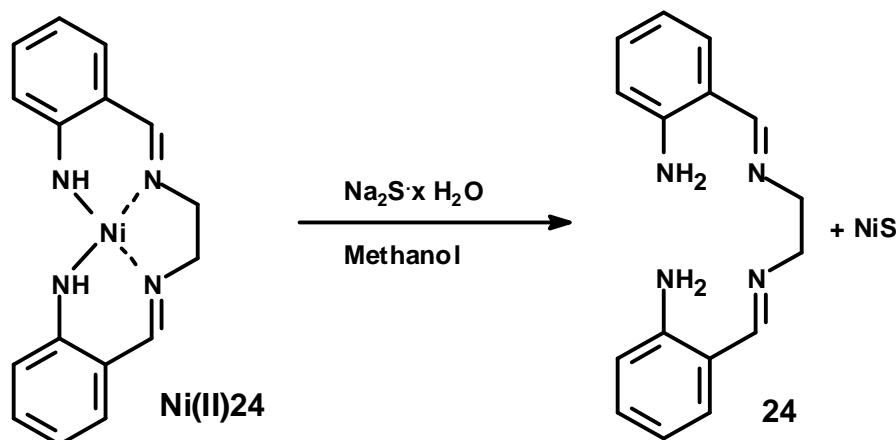


Abb. 67: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von Ni(II)17

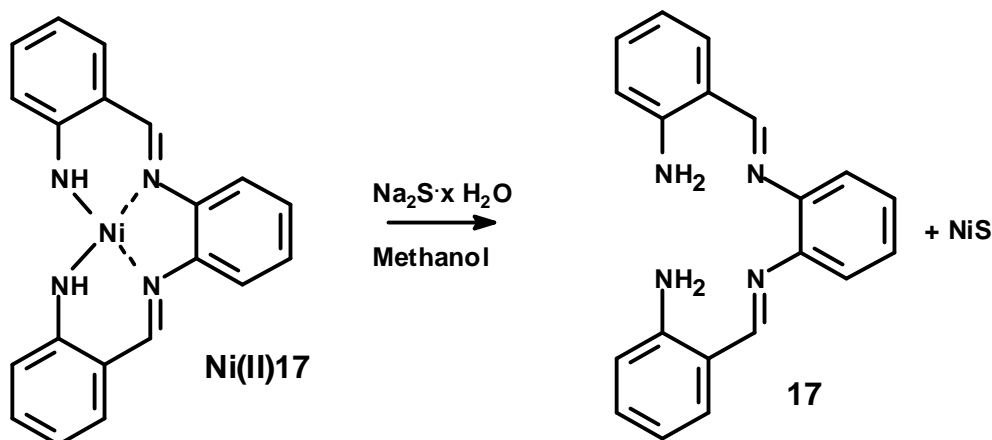
berechnet (für $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{Ni Ni(II)17}$):	371.0811	$[\text{M}^+]$
gefunden :	371.0801	
Abweichung :	2.69 ppm	

7.3.3.5 Entmetallisierung von N,N'-1,2-Ethylenbis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II) (Analog Lit. ^[48])



50.0 mg (0.15 mmol) des N,N'-Ethylenylenbis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II) **Ni(II)24** wurden in 10.0 mL Methanol gelöst und mit 10.0 mL einer 10%igen Natriumsulfid-Lösung (12.0 mmol) versetzt. Der hierbei auftretende schwarzgrüne Niederschlag wurde abfiltriert. Filtrat und Filtrerrückstand wurden getrennt voneinander weiter bearbeitet. Das Filtrat wurde dreimal mit je 5 mL Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der schwarzgrüne Filtrerrückstand wurde mit Ethanol heiß extrahiert und die ethanolische Lösung ebenfalls am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die ethanolische als auch die chloroformhaltige Phase Ligand **24** und Natriumsulfid enthielten. Daher wurde der aus der chloroformhaltigen Phase erhaltene Feststoff wieder in ca. 2 mL Chloroform aufgenommen und eine säulenchromatographische Reinigung über basisches Aluminiumoxid mit Chloroform als Laufmittel probiert. Hierbei wurde jedoch keine Trennung von Nickel(II)-sulfid und dem freien Liganden **24** erzielt. Daher wurde versucht den Liganden **24** auf andere Weise darzustellen.

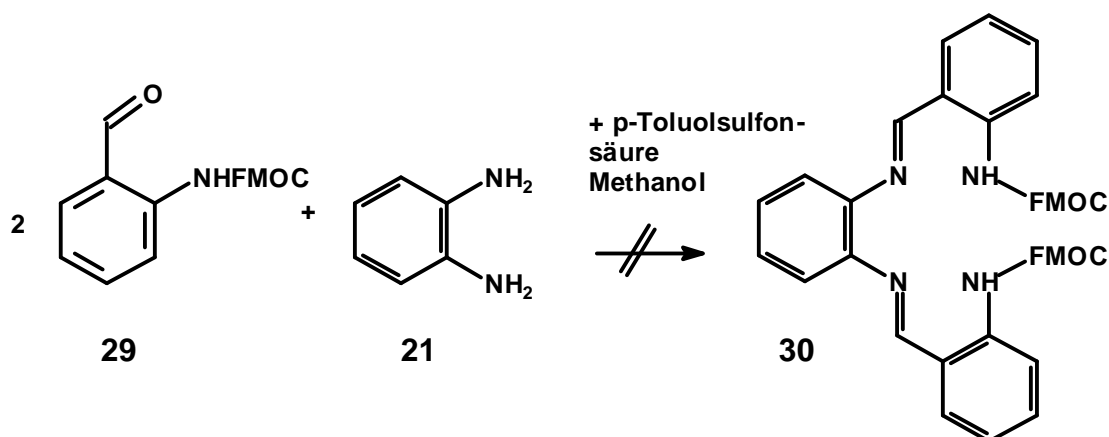
7.3.3.6 Entmetallisierung von N,N'-1,2-Phenylenebis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II) (Analog Lit. ^[48])



100 mg (0.27 mmol) des N,N'-Ethylenylenbis-(2-aminobenzylideniminato)-nickel(II) **Ni(II)17** wurden in 10.0 mL Methanol gelöst und mit 10.0 mL einer 10%igen Natriumsulfid-Lösung (12.0 mmol) versetzt. Der hierbei auftretende schwarzgrüne Niederschlag wurde abfiltriert. Filtrat und Filtrerrückstand wurden getrennt voneinander weiter bearbeitet. Das Filtrat wurde dreimal mit je 5 mL Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der schwarzgrüne Filtrerrückstand wurde mit Ethanol heiß extrahiert und die ethanolische Lösung ebenfalls am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die ethanolische als auch die chloroformhaltige Phase Ligand **17** und Natriumsulfid enthielten. Daher wurde der aus der chloroformhaltigen Phase erhaltene Feststoff wieder in ca. 2 mL Chloroform aufgenommen und eine säulenchromatographische Reinigung über basisches Aluminiumoxid mit Chloroform als Laufmittel probiert. Hierbei wurde jedoch keine Trennung von Nickel(II)-sulfid und dem freien Liganden **17** erzielt. Daher wurde versucht den Liganden **17** auf andere Weise darzustellen.

7.3.4 Fmoc-geschütztes Amphen

7.3.4.1 N,N'- Bis-(2'-Fmoc-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamin

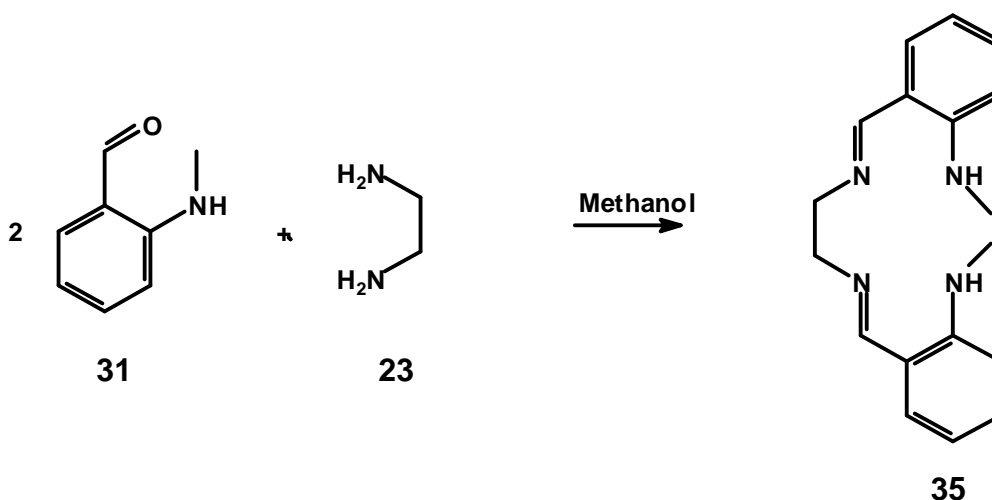


Eine Lösung von 2.74 g (8.00 mmol) 2-(N-Fmoc-amino)benzaldehyd **29** und 0.45 g (4.00 mmol) 1,2-Phenylendiamin **21** in 10.0 mL Methanol p.a. wurde in einem 25 mL Einhalskolben mit 0.10 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat 3 h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel abgetrennt und das so erhaltene gelbe, zähflüssige Öl aus Pentan umkristallisiert.

Hierbei stellte sich bei der Analyse heraus, dass die Umsetzung nicht stattgefunden hat (ESI und EI negativ, NMR sehr schwer auszuwerten).

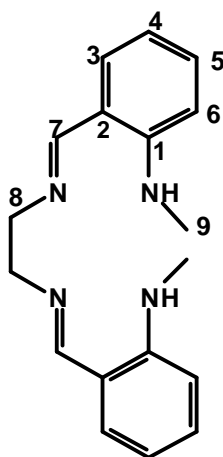
7.3.5 Methylamino-Liganden

7.3.5.1 N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]-1,2-ethyldiamin^[46, 47]



Eine Lösung von 2.10 g (15.5 mmol) 2-Methylaminobenzaldehyd **31** und 0.45 g (7.49 mmol) 1,2-Ethyldiamin **23** in 10.0 mL Methanol p.a. wurde in einem 25 mL Einhalskolben 30 min unter Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen der Lösung setzte sich ein leicht gelber Feststoff ab. Dieser wurde abfiltriert und in Methanol p.a. umkristallisiert. Es entstanden farblose Kristalle **35**.

Ausbeute an **35**: 1.75 g (5.94 mmol; 79 %, Lit.^[47] 77%, Schmp. 132°C Lit.^[47] 131-133°C)

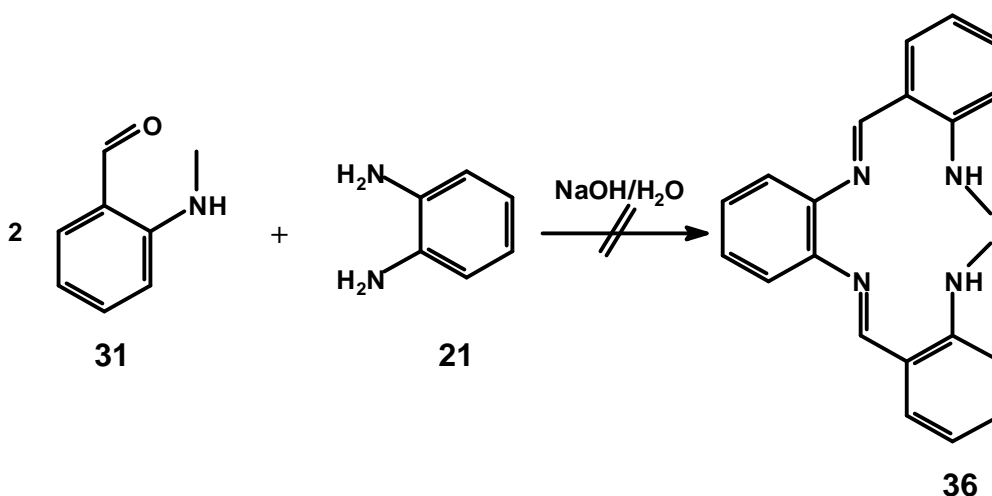


¹H-NMR (200 MHz; CDCl₃): δ[ppm]= 9.88 (s, 2 H, 7-H); 7.51 (dd, 4 H, 5-H, 6-H); 7.47 – 7.50 (m, 2 H, 4-H); 7.31 (d, 2 H, 3-H), 2.90 (s, 6 H, 9-H), 2.78 (t, 4 H, 8-H)

MS (ESI, positiver Ionenmodus, Direkteinlass, 7 μM in Acetonitril): m/z: 295 [M+H⁺], 317 [M+Na⁺]

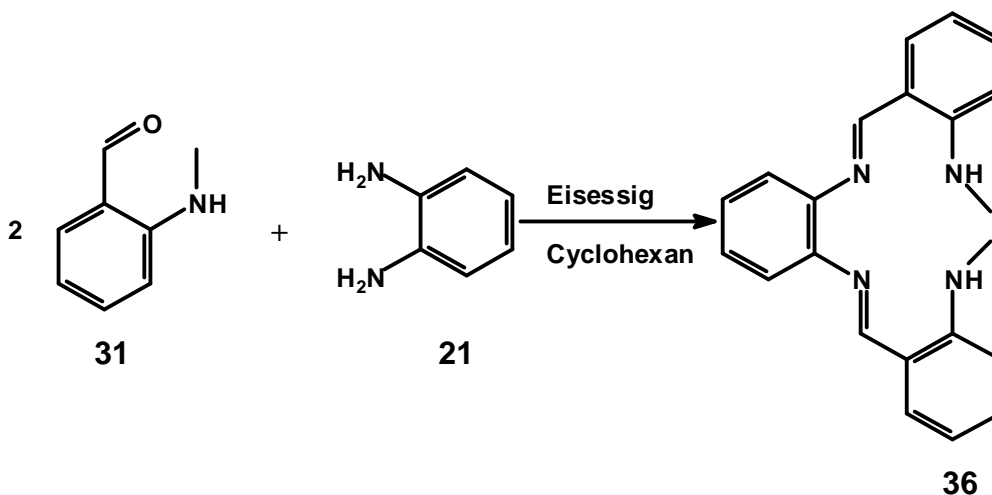
7.3.5.2 N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]-1,2-phenylendiamin (Variante 1)

[46]



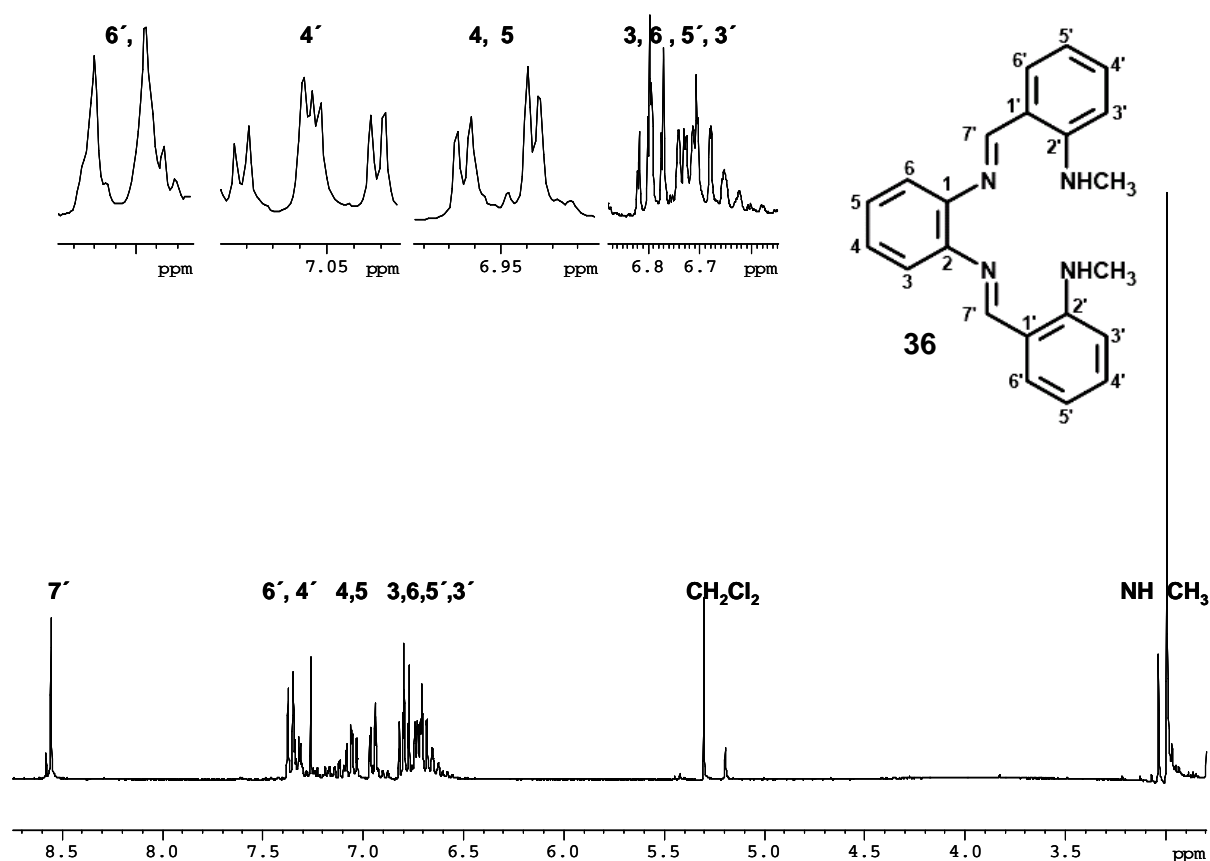
In einem 25 mL Zweihalskolben mit Schwanzhahn und Rückflusskühler mit Überdruckausgleich wurden 1.78 g (13.2 mmol) 2-(Methylamino)benzaldehyd **31** mit 0.71 g (6.60 mmol) 1,2-Phenylendiamin **21** in 6 mL VE-Wasser mit 1 mL verdünnter Natronlauge 1 h unter Rückfluss gekocht. Hierbei entstand ein gelbes Öl, das sich am Boden des Kolbens absetzte. Dieses wurde im Scheidetrichter von der wässrigen Phase abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan und das Öl zweimal mit VE-Wasser extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit Calciumchlorid getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das Produkt war ein Stoffgemisch aus der Schiffschen Monobase und der Dibase. Es wurde versucht dieses Gemisch durch MPLC-Säulenchromatographie (Hexan:Ethylacetat 7:1 Florisil) zu trennen. Hierzu wurden jeweils ca. 200 mg Rohprodukt in 1 mL Ethylacetat gelöst und mit einer Spritze über einen Filteraufsatz auf die MPLC Säule aufgespritzt. Die Trennung wurde per UV-Detektor überwacht. Es konnte jedoch kein reines Produkt isoliert werden.

7.3.5.3 N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]-1,2-phenylendiamin (Variante 2) (Analog Lit. ^[46, 54])



In einer ausgeheizten Apparatur bestehend aus einem 250 mL-Dreihalskolben mit Schwanzhahn, Tropftrichter und Rückflusskühler mit Überdruckausgleich wurden unter Schutzgas 0.97 g (9.06 mmol) 1,2-Phenylendiamin **21** in 75.0 mL absolutem Cyclohexan gelöst. Eine unter Schutzgas hergestellte Lösung von 3.11 g (23.0 mmol) 2-(Methylamino)benzaldehyd **31** in 75.0 mL absolutem Cyclohexan wurde mit 0.10 mL Eisessig versetzt und in den Tropftrichter überführt. Die 1,2-Phenylendiamin-Lösung wurde unter Rückfluss gekocht und die Aldehyd-Lösung langsam hinzuge tropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 2 h unter Rückfluss gerührt. Aus der abgekühlten Lösung schied sich ein gelber Feststoff ab. Dieser wurde in Dichlormethan aufgenommen und über eine Kieselgel-Säule (110g Kieselgel, Säulenlänge 30 cm, Durchmesser 3.5 cm) mit Dichlormethan als Laufmittel gesäult und Fraktionen von ca. 5 mL gesammelt. Die Fraktionen wurden per ESI-Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie überprüft. Produktfraktionen wurden vereinigt und bis zur Trockene eingeeengt. Hierbei wurde ein gelber Feststoff **36** erhalten. Der per ¹H-NMR untersucht wurde. Da die Substanz noch Verunreinigungen aufwies, wurde sie erneut über eine Kieselgel-Säule (110g Kieselgel, Säulenlänge 30 cm, Durchmesser 3.5 cm) diesmal mit Hexan/Ethylacetat 4:1 als Laufmittel gereinigt. Es wurden Fraktionen von ca. 2 mL gesammelt und per ESI-Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie überprüft. Produktfraktionen wurden eingeeengt und per ¹H-NMR auf Reinheit untersucht.

Ausbeute an **36**: 349.8 mg (1.02 mmol, 11 %, Schmp. 275°C (Zers.))

Abb. 68: ^1H -NMR von **36** in CDCl_3

^1H -NMR (500 MHz; CDCl_3): δ = 8.54 (s, 2 H, $7'$ -H); 7.40 (d; $^3J(5'-\text{H}, 6'-\text{H}) = 7.60$ Hz, 2 H, $6'-\text{H}$); 7.15 – 7.05 (m, 2 H, $4'-\text{H}$); 6.95 (dd, $^3J(3-\text{H}, 4-\text{H}) = ^3J(5-\text{H}, 6-\text{H}) = 7.72$ Hz; 2 H, $4-\text{H}, 5-\text{H}$); 6.85-6.60 (m, 6 H, $3-\text{H}, 6-\text{H}, 3'-\text{H}, 5'-\text{H}$), 3.02 (s, 2 H, NH), 2.98 (s, 6 H, CH_3)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ = 164.14 (7-C); 148.59 ($2'-\text{C}$); 148.16 (1-C, 2-C); 134.34 (5-C, 6-C); 133.85 ($5'-\text{C}$); 131.55 ($6'-\text{C}$); 126.90 (3-C, 6-C); 118.10 ($4'-\text{C}$); 117.90 ($1'-\text{C}$); 116.44 ($3'-\text{C}$), 26.54 (CH_3)

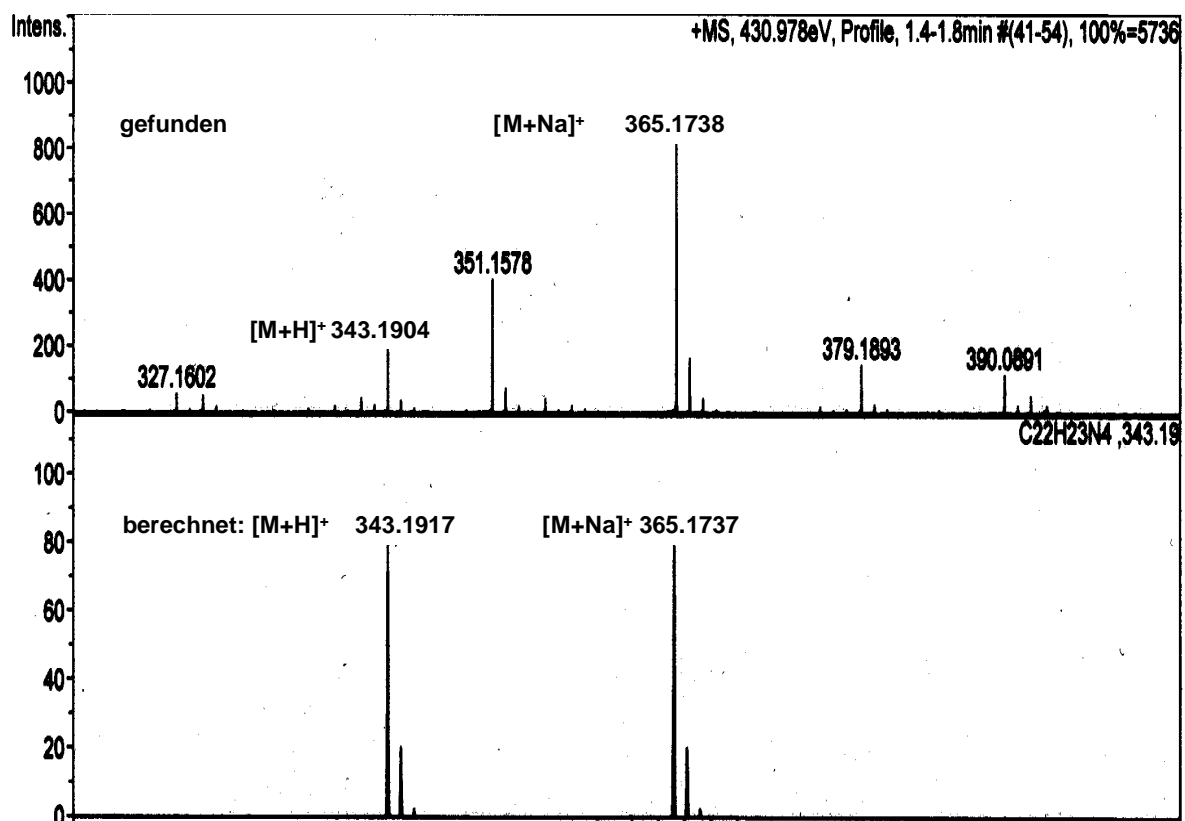
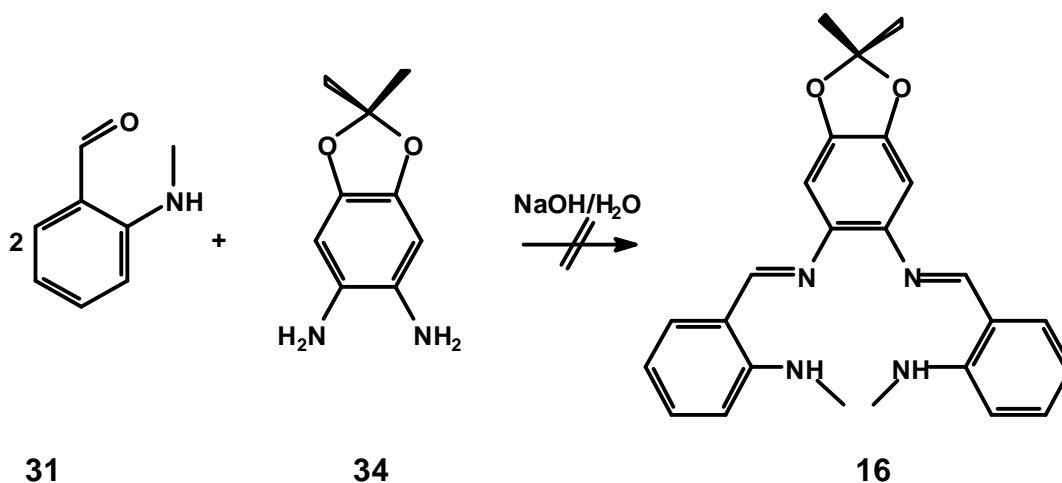
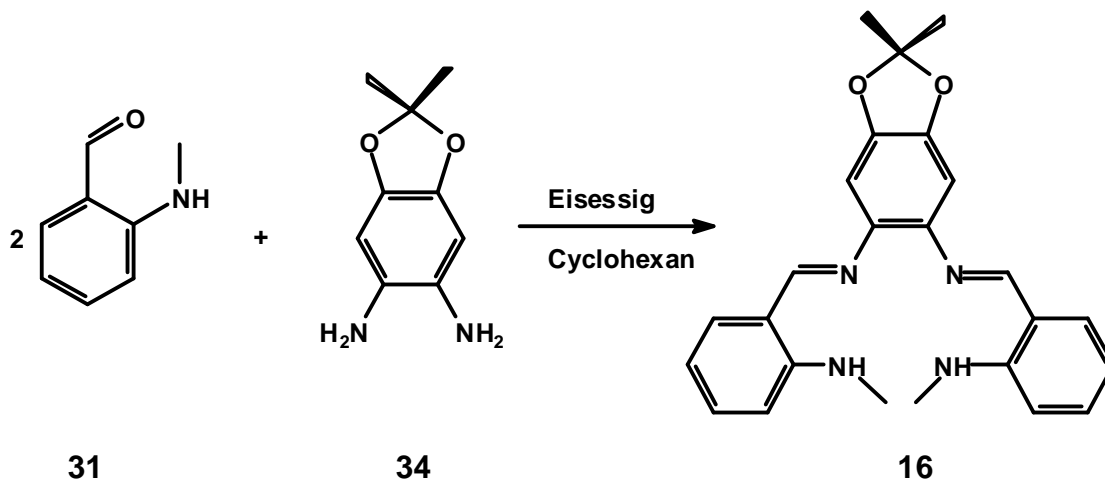


Abb. 69: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von 36

berechnet (für C ₂₂ H ₂₃ N ₄):	343.1917	[M + H ⁺]
gefunden :	343.1904	
Abweichung :	3.79 ppm	
berechnet (für C ₂₂ H ₂₂ N ₄ 54):	365.1737	[M + Na ⁺]
gefunden :	365.1738	
Abweichung :	0.27 ppm	

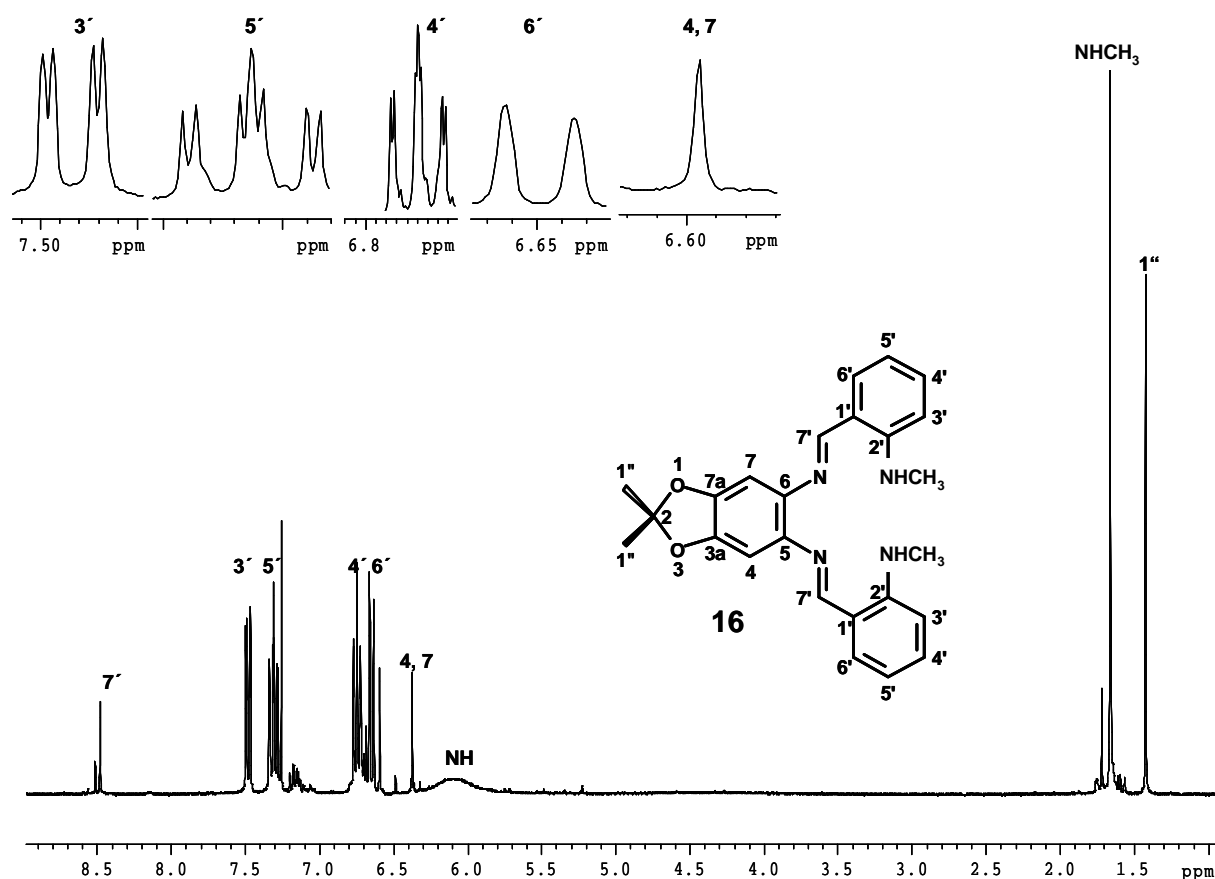
7.3.5.4 N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]-2,2-dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin (Variante 1 Analog Lit.^[46])

In einem 25 mL Zweihalskolben mit Schwanzhahn und Rückflusskühler mit Überdruckausgleich wurden 2.06 g (17.0 mmol) 2-(Methylamino)benzaldehyd **31** mit 1.90 g (6.60 mmol) 2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin **34** in 10 mL mit Argon gespültem VE-Wasser mit 1.50 mL 2 molarer Natronlauge 1 h unter Rückfluss gekocht. Hierbei entstand ein gelbes Öl, das sich am Boden des Kolbens absetzte. Dieses wurde im Scheidetrichter von der wässrigen Phase abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan und das Öl zweimal mit VE-Wasser extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit Calciumchlorid getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das Produkt enthielt ein Stoffgemisch aus der Schiffchen Mono- und der Dibase. Es wurde versucht dieses Gemisch durch MPLC-Säulenchromatographie (Hexan:Ethylacetat 7:1 Florisil) zu reinigen. Hierzu wurden jeweils ca. 200 mg Rohprodukt in 1 mL Ethylacetat gelöst und mit einer Spritze über einen Filteraufsatz auf die MPLC Säule aufgespritzt. Die Trennung wurde per UV-Detektor überwacht. Es konnte jedoch kein reines Produkt isoliert werden.

7.3.5.5 N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]- 2,2-dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin (Variante 2) (Analog Lit. ^[46, 54])

In einer ausgeheizten Apparatur bestehend aus einem 250 mL-Dreihalskolben mit Schwanzhahn, Tropftrichter und Rückflusskühler mit Überdruckausgleich wurden unter Schutzgas 1.90 g (6.60 mmol) 2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin **34** in 75 mL absolutem Cyclohexan gelöst. Eine unter Schutzgas hergestellte Lösung von 2.06 g (17.0 mmol) 2-(Methylamino)benzaldehyd **31** in 75 mL absolutem Cyclohexan wurde mit 0.10 mL Eisessig versetzt und in den Tropftrichter überführt. Die 1,2-Phenylendiamin-Lösung wurde unter Rückfluss gekocht und die Aldehyd-Lösung langsam hinzuge tropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 2 h unter Rückfluss gerührt. Aus der abgekühlten Lösung schied sich ein gelber Feststoff ab. Dieser wurde in Dichlormethan aufgenommen und über eine Kieselgel-Säule (110g Kieselgel, Säulenlänge 30 cm, Durchmesser 3.5 cm) mit Dichlormethan als Laufmittel gesäult und Fraktionen von ca. 5 mL gesammelt. Die Fraktionen wurden per ESI-Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie überprüft. Produktfraktionen wurden vereinigt und bis zur Trockene eingeeengt. Hierbei wurde ein gelber Feststoff erhalten. Der per ¹H-NMR untersucht wurde. Da die Substanz noch Verunreinigungen durch Nebenprodukte aufwies wurde sie erneut über eine Kieselgel-Säule (110g Kieselgel, Säulenlänge 30 cm, Durchmesser 3.5 cm) diesmal mit Hexan/Ethylacetat 4:1 als Laufmittel gereinigt. Es wurden Fraktionen von ca. 2 mL gesammelt und per ESI-Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie überprüft. Produktfraktionen wurden eingeeengt und per ¹H-NMR auf Reinheit untersucht.

Ausbeute an **16**: 275.8 mg (0.67 mmol, 10 %, Schmp. 176°C (Zers.))

Abb. 70: ^1H -NMR von 16 in CDCl_3

^1H -NMR (500 MHz; CDCl_3): δ = 8.52 (s, 2 H, 7'-H); 7.48 (dd, $^3J(3'\text{-H}, 4'\text{-H}) = 7.70$ Hz; $^4J(5'\text{-H}, 3'\text{-H}) = 2.60$ Hz, 2 H, 3'-H); 7.40 – 7.26 (m, 2 H, 5'-H); 6.75 – 6.50 (m, 2 H, 4'-H); 6.65 (d, $^3J(5'\text{-H}, 6'\text{-H}) = 7.72$ Hz; 2 H, 6'-H); 6.58 (s, 2 H, 4-H, 7-H), 6.40-5.90 (br, 2 H, NH), 1.72 (s, 6 H, NCH_3), 1.47 (s, 6 H, 1''-H)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ = 163.54 (7'-C); 150.95 (3a-C, 7a-C), 149.75 (2'-C); 145.47 (5-C, 6-C); 132.66 (5'-C); 131.34 (6'-C); 129.61 (4'-C); 126.59 (3'-C); 117.45 (2-C); 116.25 (1'-C), 67.12 (4-C, 7-C), 26.43 (NCH_3), 25.68 (1''-C)

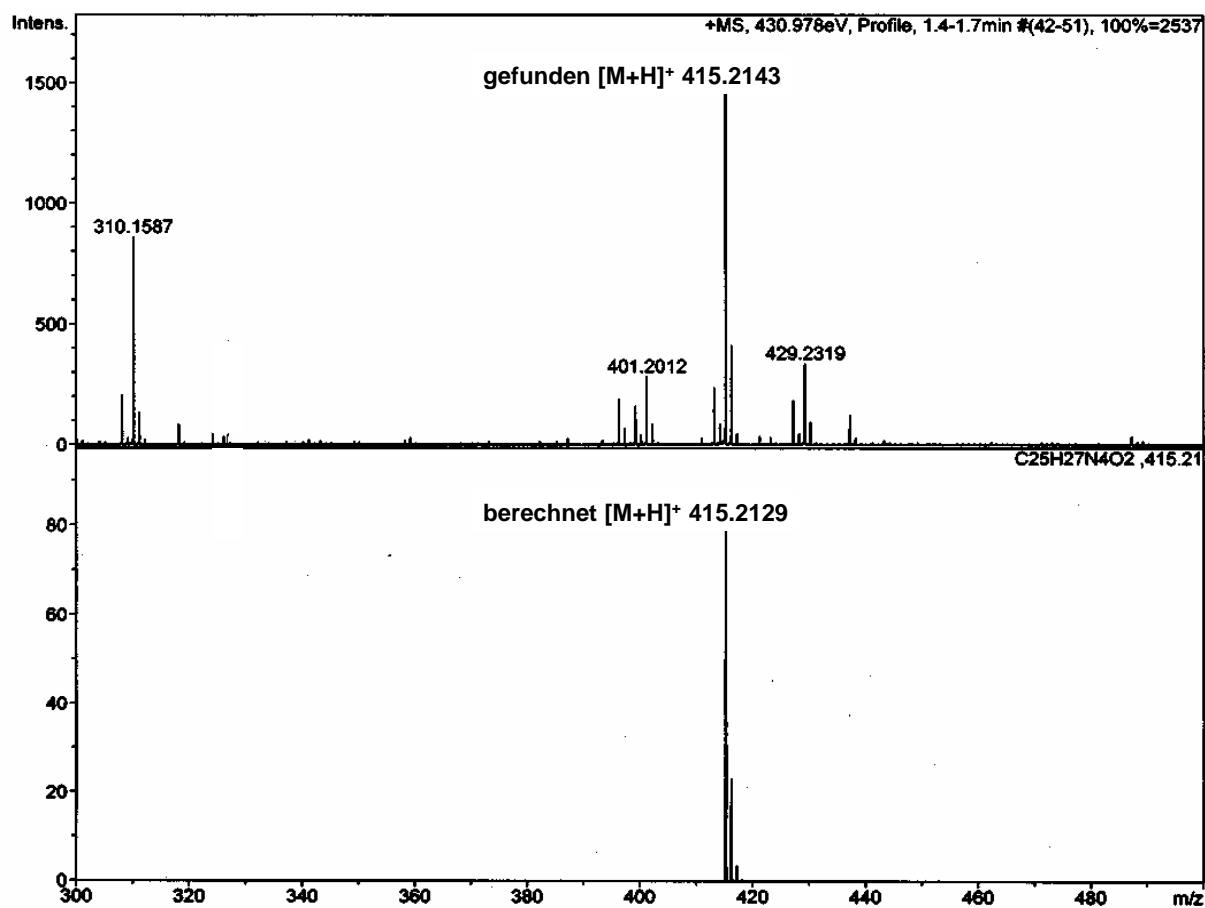
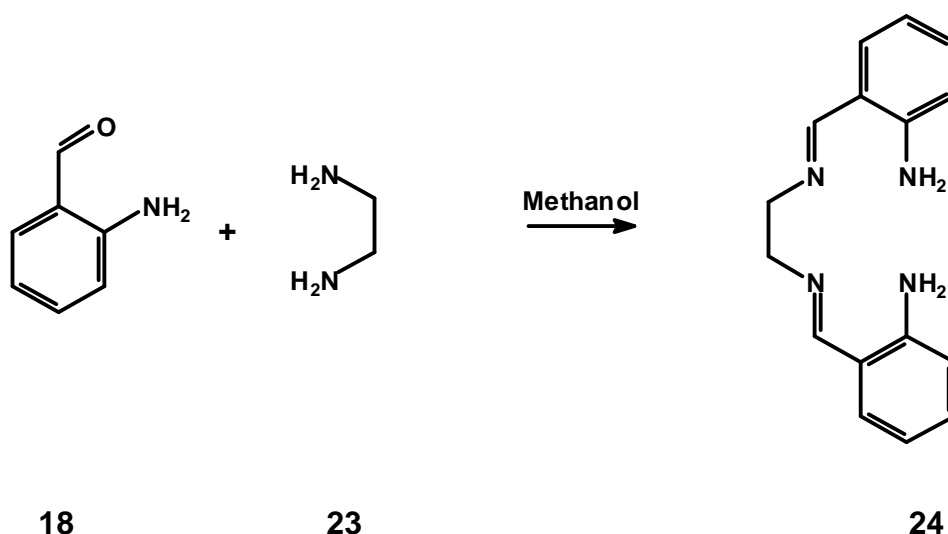


Abb. 71: ESI Spektrum (positiver Ionenmodus) von 16

berechnet (für C ₂₅ H ₂₇ N ₄ O ₂ 16):	415.2129	[M + H ⁺]
gefunden :	415.2143	
Abweichung :	3.37 ppm	

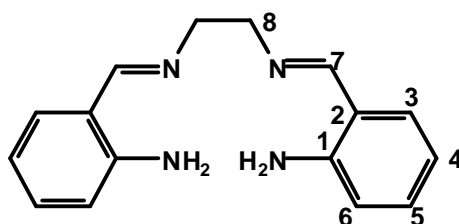
7.3.6 Amino-Liganden

7.3.6.1 N,N'-Bis-[2'-aminobenzyliden]-1,2-ethyldiamin^[46, 47]



Eine Lösung von 1.88 g (15.5 mmol) 2-Aminobenzaldehyd **18** und 0.45 g (7.49 mmol) 1,2-Ethyldiamin **23** in 10.0 mL Methanol p.a. wurde in einem 25 mL Einhalskolben 1 h unter Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen der Lösung setzte sich ein leicht gelber Feststoff ab. Dieser wurde abfiltriert und aus Methanol p.a. umkristallisiert. Es entstanden farblose Kristalle **24**.

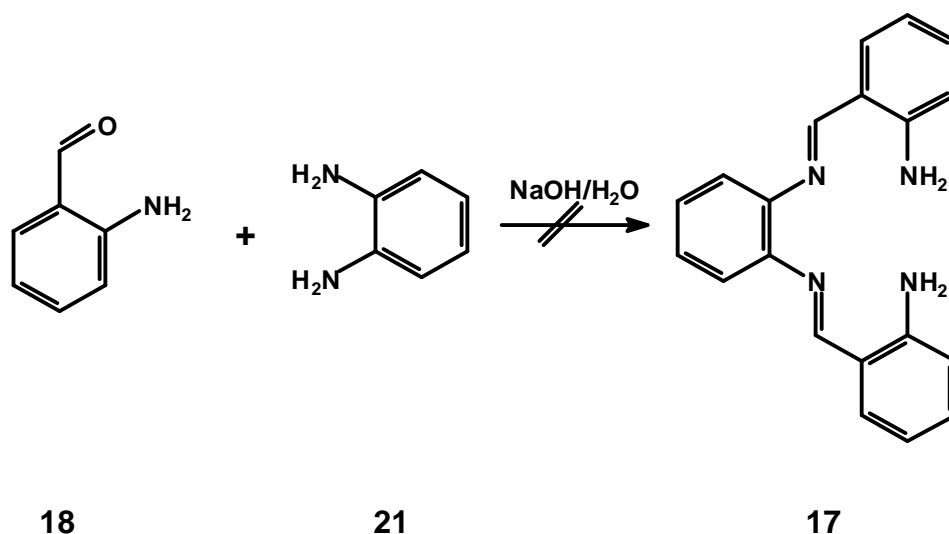
Ausbeute an **24**: 1.60 g (6.01 mmol; 80 % Lit.^[47] 92 %, Schmp. 184°C Lit.^[47] 182-184°C)



¹H-NMR (500 MHz; DMSO-d₆): δ[ppm]= 8.37 (s, 2 H, 7-H); 7.19 (dd, ³J{6-H, 5-H}= 7.70 Hz, ⁴J{6-H, 4-H}= 1.25 Hz, 2 H, 6-H); 7.14 (s, b, 4 H, NH₂) 7.06 (dt, ³J{4-H, 3-H}= 8.15 Hz, ³J{5-H, 5-H}= 8.40 Hz, ⁴J{4-H, 6-H}= 1.25 Hz, 2 H, 4-H); 6.67 (d, ³J{4-H, 3-H}= 8.15 Hz, 2 H, 3-H), 6.51 (dt, ³J{6-H, 5-H}= 7.70 Hz, ³J{5-H, 4-H}= 8.40 Hz, 2 H, 5-H) 3.81 (s, 4 H, 8-H)

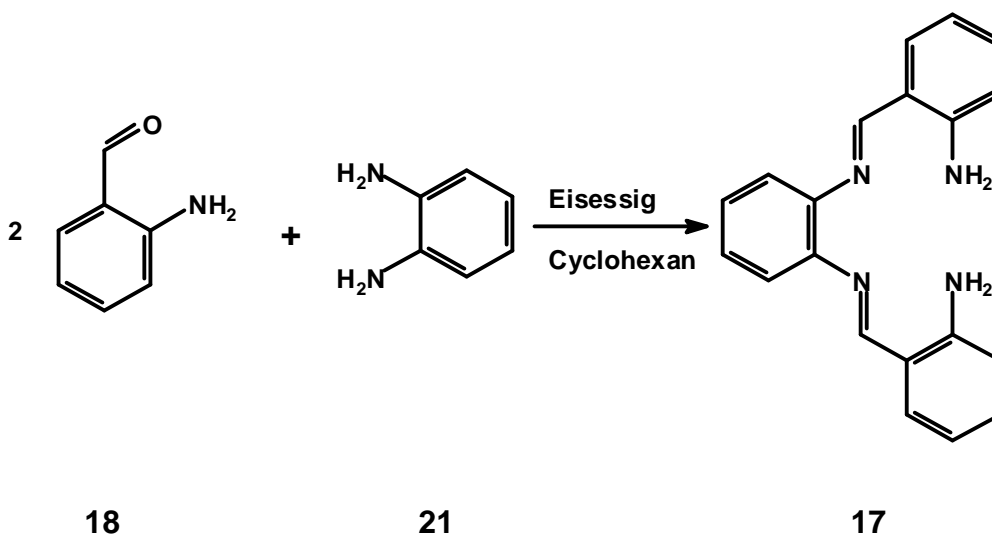
¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ[ppm]= 165.11 (7-C), 149.13 (2-C), 133.22 (1-C), 130.56 (5-C), 116.05 (4-C), 114.88 (3-C), 114.40 (6-C), 61.75 (8-C)

MS (ESI, positiver Ionenmodus, Direkteinlass, 7 μM in Acetonitril): m/z: 267 [M+H⁺], 312 [M-H⁺+2Na⁺]

7.3.6.2 N,N'-Bis-(2'-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamin (Variante 1)^[46]

In einem 25 mL Zweihalskolben mit Schwanzhahn und Rückflusskühler mit Überdruckausgleich wurden 1.61 g (13.3 mmol) 2-Aminobenzaldehyd **18** mit 600 mg (5.50 mmol) 1,2-Phenylendiamin **21** in 6 mL VE-Wasser mit 0.60 mL 20%ige Natronlauge 1 h unter Rückfluss gekocht. Hierbei entstand ein gelbes Öl, das sich am Boden des Kolbens absetzte. Dieses wurde im Scheidetrichter von der wässrigen Phase abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan und das Öl zweimal mit VE-Wasser extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über CaCl₂ getrocknet. Anschließend wurde die Lösung mit trockenem HCl-Gas gesättigt. Dazu wurde durch Zutropfen von 25.0 mL H₂SO₄ zu 30.0 g festem NaCl HCl-Gas entwickelt. Dieses wurde vor dem Einleiten in die Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Bei der Sättigung der Lösung fiel ein farbloser Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert und in 50.0 mL gesättigter Sodalösung aufgenommen, wobei er sich jedoch nur teilweise löste. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat zweimal mit je 20.0 mL Dichlormethan extrahiert und die organische Phase über CaCl₂ getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Filtrat weitestgehend eingengt und im Tiefkühlfach auskristallisiert.

Hierbei wurden 374 mg Rohprodukt **17** als hellgelbes Pulver erhalten, das zunächst im Ölpumpenvakuum getrocknet wurde. Es wurden ¹H-NMR und ESI Spektren des Rohproduktes aufgenommen, wobei sich herausstellte, dass das gewünschte Produkt nicht entstanden ist.

7.3.6.3 N,N'-Bis-(2'-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamin (Variante 2) (Analog Lit. ^[46, 54])

In einer ausgeheizten Apparatur bestehend aus 250 mL Dreihalskolben, Schwanzhahn, kühlbaren Tropftrichter und Wasserabscheider mit Rückflusskühler und Druckausgleich wurden unter Argon 249 mg (2.30 mmol) 1,2-Phenylendiamin **21** in 30.0 mL Cyclohexan p.a. vorgelegt und mit 0.10 mL Eisessig versetzt. 584 mg (4.82 mmol) 2-Aminobenzaldehyd **18** wurden unter Schutzgas in 30.0 mL Cyclohexan p.a. im Ultraschallbad gelöst, in den Tropftrichter überführt und auf 6°C heruntergekühlt. Der Kolben wurde im Ölbad bei einer Badtemperatur von 115°C erhitzt und in der Siedehitze die 2-Aminobenzaldehydlösung innerhalb von 1 h hinzugetropft. Anschließend wurden noch einmal 0.10 mL Eisessig zugesetzt und solange unter Rückfluss gekocht bis sich kein Wasser mehr abschied. Nach beendeter Reaktion ließ man die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen. Hierbei wurde ein hellgelber Niederschlag in einer gelben Lösung erhalten. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abfiltriert und dreimal mit je 5 mL Cyclohexan nachgewaschen. Der Filtrückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und per ¹H-NMR und ESI-Massenspektrometrie untersucht. Das Filtrat wurde im Scheidetrichter dreimal mit je 20 mL gesättigter Sodalösung extrahiert und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Trockenmittels wurde die Lösung bis zur Trockene eingeeengt und ebenfalls ein gelber Feststoff **17** erhalten, der per ¹H-NMR und ESI-Massenspektrometrie untersucht wurde.

Es zeigte sich, dass beide Feststoffe sowohl Produkt **17** als auch Verunreinigungen durch Nebenprodukte enthielten.

Eine Dünnschichtchromatographie in Hexan/Ethylacetat 4:1 auf Kieselgel zeigte, dass der zuerst erhaltene Niederschlag weniger verunreinigt war. Es wurde daher eine Reinigung über eine Kieselgel-Säule mit Hexan/Ethylacetat 4:1 durchgeführt. Hierbei wurde die Reinheit der Fraktionen per Dünnschichtchromatographie und ESI-Massenspektrometrie überprüft. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und erneut über eine längere Kieselgel-Säule mit Hexan/Ethylacetat 4:1 gereinigt.

Ausbeute an **17**: 64.4 mg (0.22 mmol, 10 %, Schmp. 252°C (Zers.))

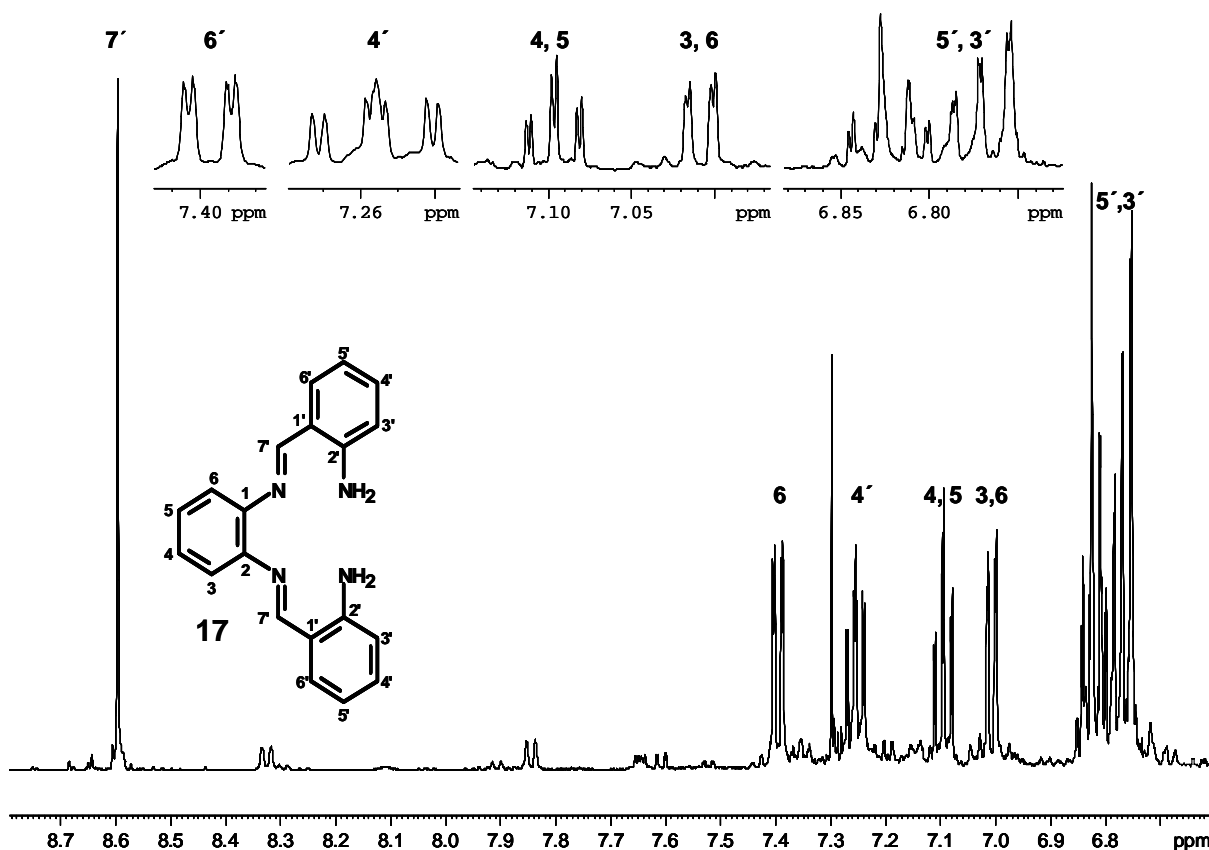


Abb. 72: ¹H-NMR von **17** in CDCl₃

¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ = 8.54 (s, 2 H, 7'-H); 7.40 (dd, ³*J*(5'-H, 4'-H) = 7.70 Hz; ³*J*(5'-H, 6'-H) = 7.60 Hz, 4 H, 5'-H, 6'-H); 7.28 – 7.22 (m, 2 H, 4'-H); 7.17 – 7.00 (m, 2 H, 4-H, 5-H); 6.95 (dd, ³*J*(3-H, 4-H) = ³*J*(5-H, 6-H) = 7.72 Hz; 2 H, 3-H, 6-H); 6.85-6.70 (m, 4 H, 3'-H, 5'), 4.63 (br, 4 H, NH₂)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ = 164.14 (7-C); 148.59 (2'-C); 148.16 (1-C, 2-C); 134.34 (5-C, 6-C); 133.85 (5'-C); 131.55 (6'-C); 126.90 (3-C, 6-C); 118.10 (4'-C); 117.90 (1'-C); 116.44 (3'-C)

IR (KBr):

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}]$ = 3456 (s, $\nu(\text{NH}_2)$), 3026 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 2933 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{aliph.}})$), 1615 (s, $\nu(\text{C=N})$)

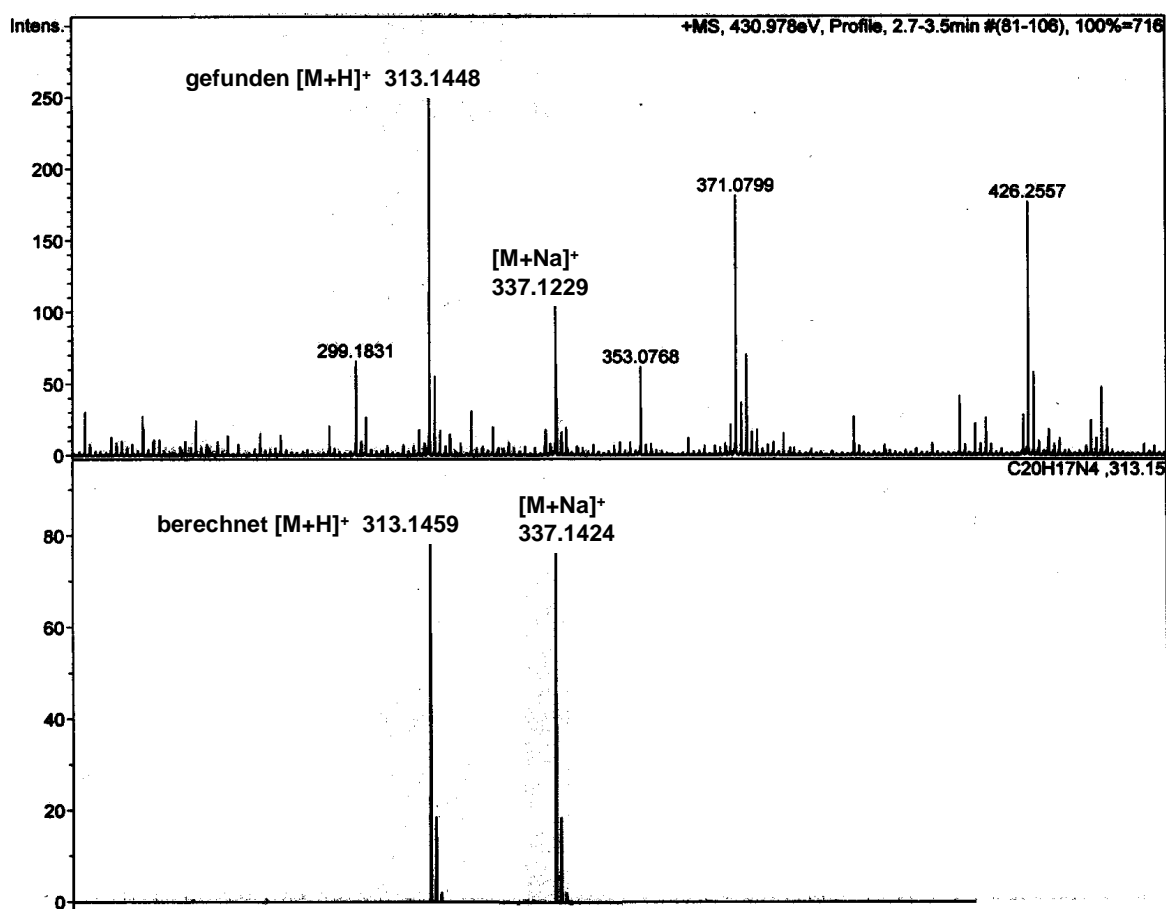
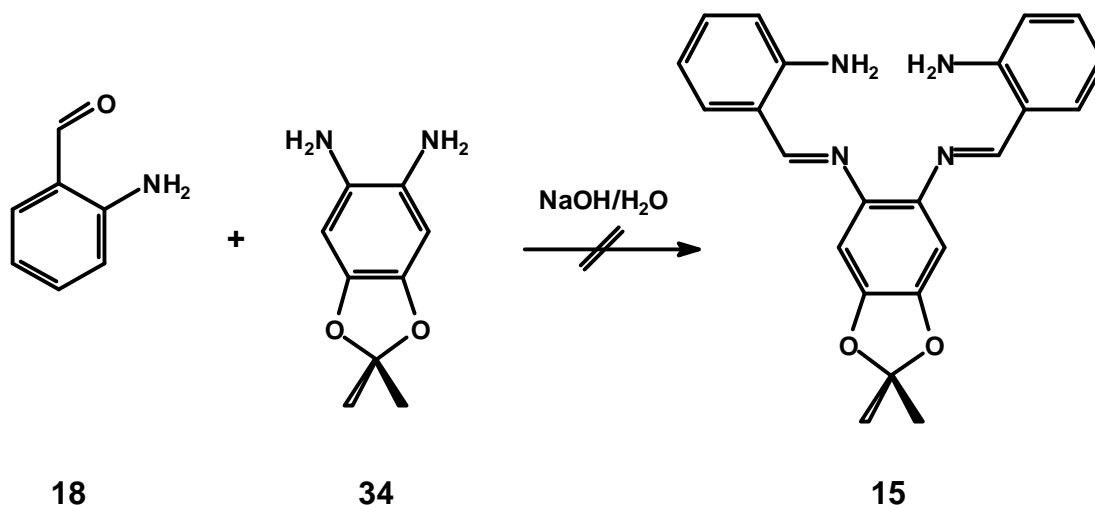


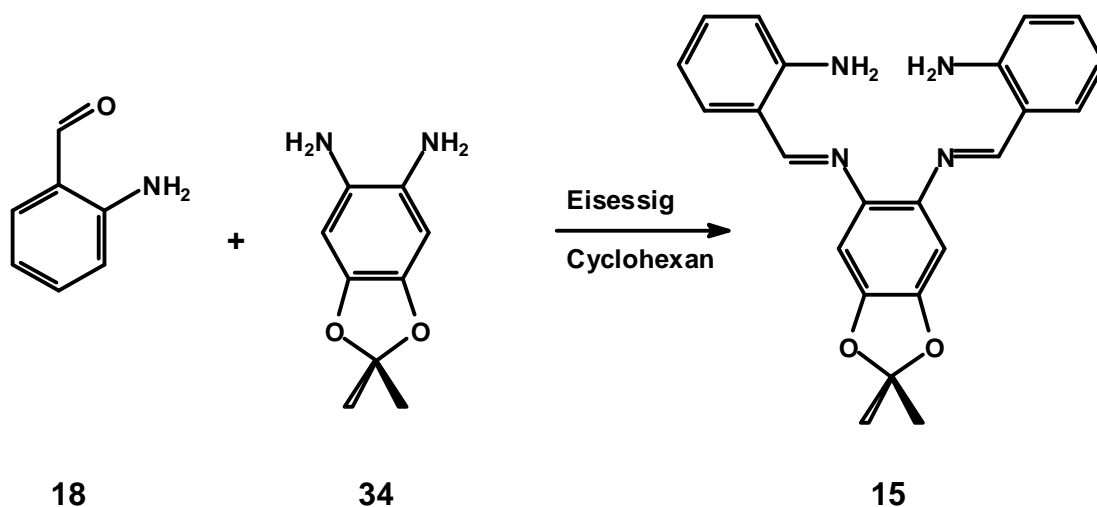
Abb. 73: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von 17

berechnet (für $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_4$ 17):	313.1448	$[\text{M} + \text{H}^+]$
gefunden :	313.1459	
Abweichung :	3.51 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{Na}$ 17):	337.1424	$[\text{M} + \text{Na}^+]$
gefunden :	337.1429	
Abweichung :	1.48 ppm	

7.3.6.4 N,N'-Bis-[1-(2-amino-phenyl)-methyliden]-2,2-dimethyl-benzo-[1,3]-dioxol-5,6-diamin (Variante 1 Analog Lit.^[46])

In einem 25 mL Zweihalskolben mit Schwanzhahn und Rückflusskühler mit Überdruckausgleich wurden 1.60 g (13.2 mmol) 2-Aminobenzaldehyd **18** mit 1.33 g (7.40 mmol) 2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxol-5,6-diamin **34** in 6 mL VE-Wasser mit 1 mL verdünnter Natronlauge 1 h unter Rückfluss gekocht. Hierbei entstand ein gelbes Öl, das sich am Boden des Kolbens absetzt. Dieses wurde im Scheidetrichter von der wässrigen Phase abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan und das Öl zweimal mit VE-Wasser extrahiert. Anschließend wurde versucht das Rohprodukt mittels MPLC (Hexan:Ethylacetat 7:1 Florisil) zu reinigen. Hierzu wurden jeweils ca. 200 mg Rohprodukt **15** in 1 mL Ethylacetat gelöst und mit einer Spritze über einen Filteraufsatz auf die MPLC Säule aufgespritzt. Die Trennung wurde per UV-Detektor überwacht. Es konnte jedoch kein reines Produkt isoliert werden.

7.3.6.5 N,N'-Bis-[1-(2-amino-phenyl)-methyliden]-2,2-dimethyl-benzo-[1,3]-dioxol-5,6-diamin (Variante 2) (Analog Lit. ^[46, 54])

In einer ausgeheizten Apparatur bestehend aus 250 mL Dreihalskolben, Schwanzhahn, kühlbaren Tropftrichter und Wasserabscheider mit Rückflusskühler und Druckausgleich wurden unter Argon 1.33 g (7.40 mmol) 2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxol-5,6-diamin **34** in 90 mL Cyclohexan p.a. vorgelegt und mit 0.10 mL Eisessig versetzt. 2.16 g (17.8 mmol) 2-Aminobenzaldehyd **18** wurden unter Schutzgas in 60.0 mL Cyclohexan p.a. im Ultraschallbad gelöst, in den Tropftrichter überführt und auf 6°C heruntergekühlt. Der Kolben wurde im Ölbad bei einer Badtemperatur von 115°C erhitzt und in der Siedehitze die 2-Aminobenzaldehydlösung innerhalb von 1 h hinzugetropft. Anschließend wurden noch einmal 0.10 mL Eisessig zugesetzt und solange unter Rückfluss gekocht bis sich kein Wasser mehr abschied. Nach beendeter Reaktion ließ man die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen. Hierbei wurde ein hellgelber Niederschlag in einer gelben Lösung erhalten. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abfiltriert und dreimal mit je 5 mL Cyclohexan nachgewaschen. Der Filtrerrückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und per ¹H-NMR und ESI-Massenspektrometrie untersucht. Das Filtrat wurde im Scheidetrichter dreimal mit je 20 mL gesättigter Sodalösung extrahiert und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Trockenmittels wurde die Lösung bis zur Trockene eingeeengt und ebenfalls ein gelber Feststoff erhalten, der per ¹H-NMR und ESI-Massenspektrometrie untersucht wurde. Es zeigte sich, dass beide Feststoffe sowohl Produkt **15** als auch Verunreinigungen durch Nebenprodukte enthielten.

Eine Dünnschichtchromatographie in Hexan/Ethylacetat 4:1 auf Kieselgel zeigte, dass der zuerst erhaltene Niederschlag weniger verunreinigt war. Es wurde daher eine Reinigung über eine Kieselgel-Säule mit Hexan/Ethylacetat 4:1 durchgeführt. Hierbei wurde die Reinheit der Fraktionen per Dünnschichtchromatographie und ESI-Massenspektrometrie überprüft. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und erneut über eine längere Kieselgel-Säule mit Hexan/Ethylacetat 4:1 gereinigt.

Ausbeute an **15**: 309 mg (0.80 mmol, 11 %, Schmp. 159°C (Zers.))

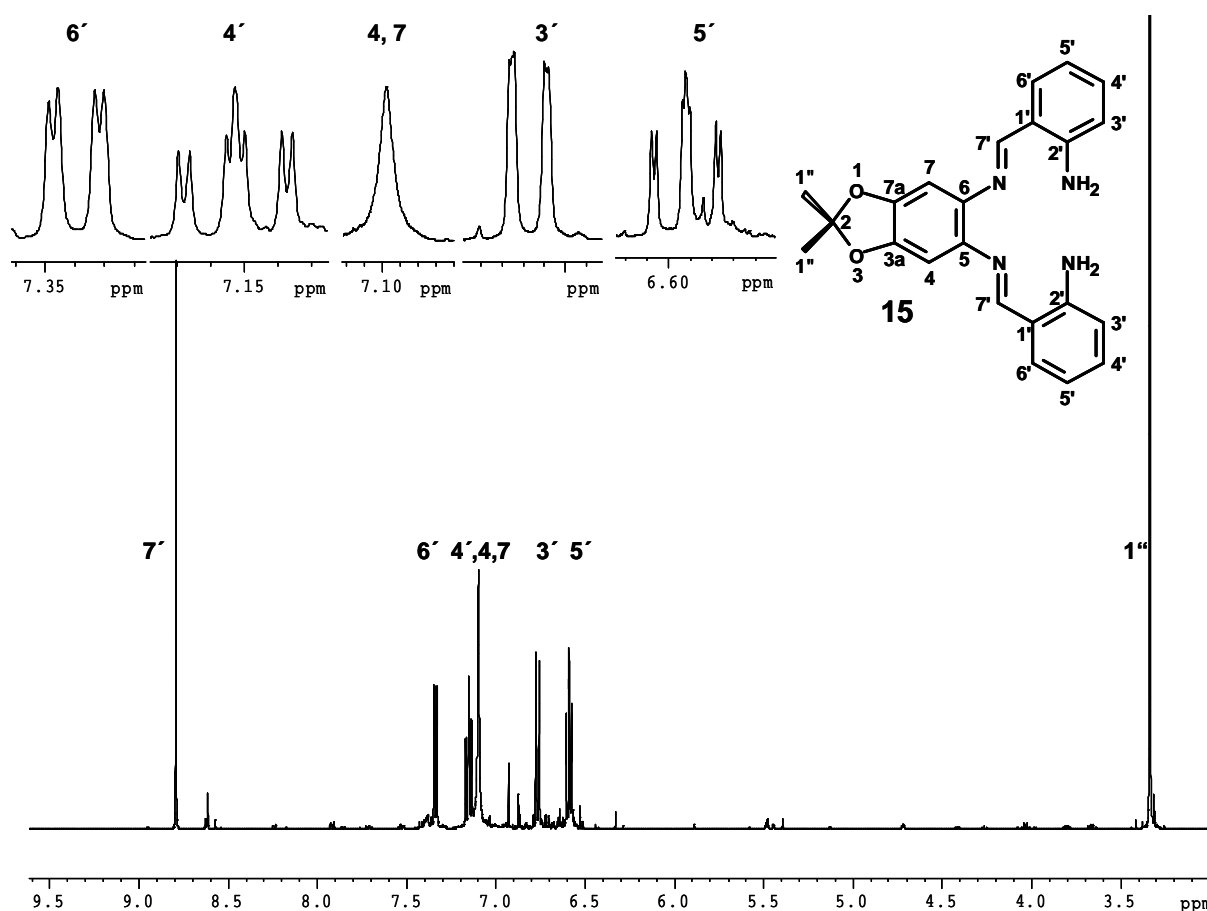


Abb. 74: $^1\text{H-NMR}$ von **15** in CDCl_3

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CDCl_3): δ = 8.81 (s, 2 H, 7'-H); 7.32 (d, $^3J(3'\text{-H}, 4'\text{-H}) = 7.84$ Hz, 2 H, 6'-H); 7.16 (dt, 2 H, 4'-H); 7.10 (s; 2 H, 4-H, 7-H); 6.87 (dd, $^3J(3'\text{-H}, 4'\text{-H}) = 7.84$ Hz; $^3J(4'\text{-H}, 5'\text{-H}) = 7.97$ Hz, 2 H, 3'-H), 6.57 (dt, 2 H, 5'-H), 3.61 (br, 4 H, NH_2) 1.67 (s, 6 H, 1''-H)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ = 163.85 (7'-C); 150.69 (3a-C, 7a-C), 149.95 (2'-C); 147.44 (5-C, 6-C); 133.62 (5'-C); 131.64 (6'-C); 129.56 (4'-C); 126.59 (3'-C); 117.41 (2-C); 115.15 (1'-C), 67.02 (4-C, 7-C), 25.48 (1''-C)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3457 (s, ν (NH_2)), 3056 (w, ν ($\text{CH}_{\text{arom.}}$)), 2943 (w, ν ($\text{CH}_{\text{aliph.}}$)), 1618 (s, ν ($\text{C}=\text{N}$)), 1376, 1317 (m, ν ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$)), 1209, 1156 (m, ν ($\text{C}-\text{O}$))

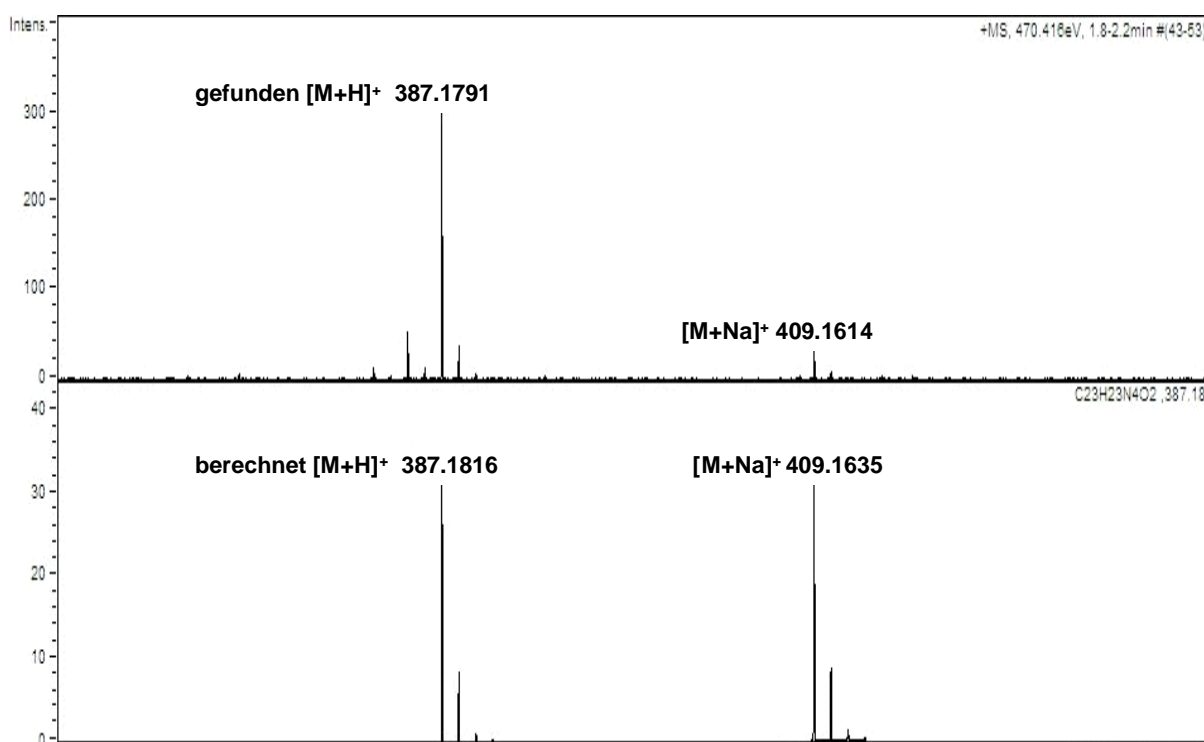


Abb. 75: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von 15

berechnet (für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_2$ **15**): 387.1816 $[\text{M} + \text{H}^+]$

gefunden : 387.1791

Abweichung : 6.46 ppm

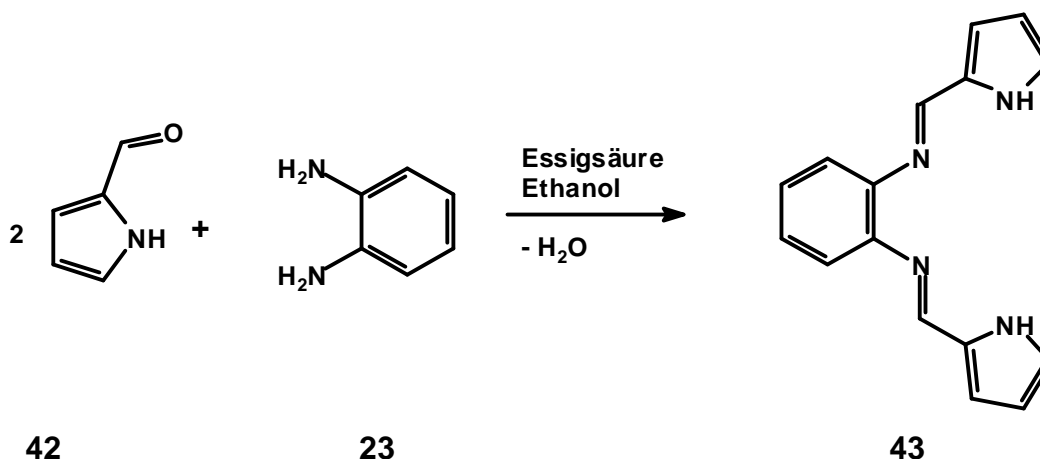
berechnet (für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$ **15**): 409.1635 $[\text{M} + \text{Na}^+]$

gefunden : 409.1614

Abweichung : 5.13 ppm

7.3.7 Pyrrol-Liganden

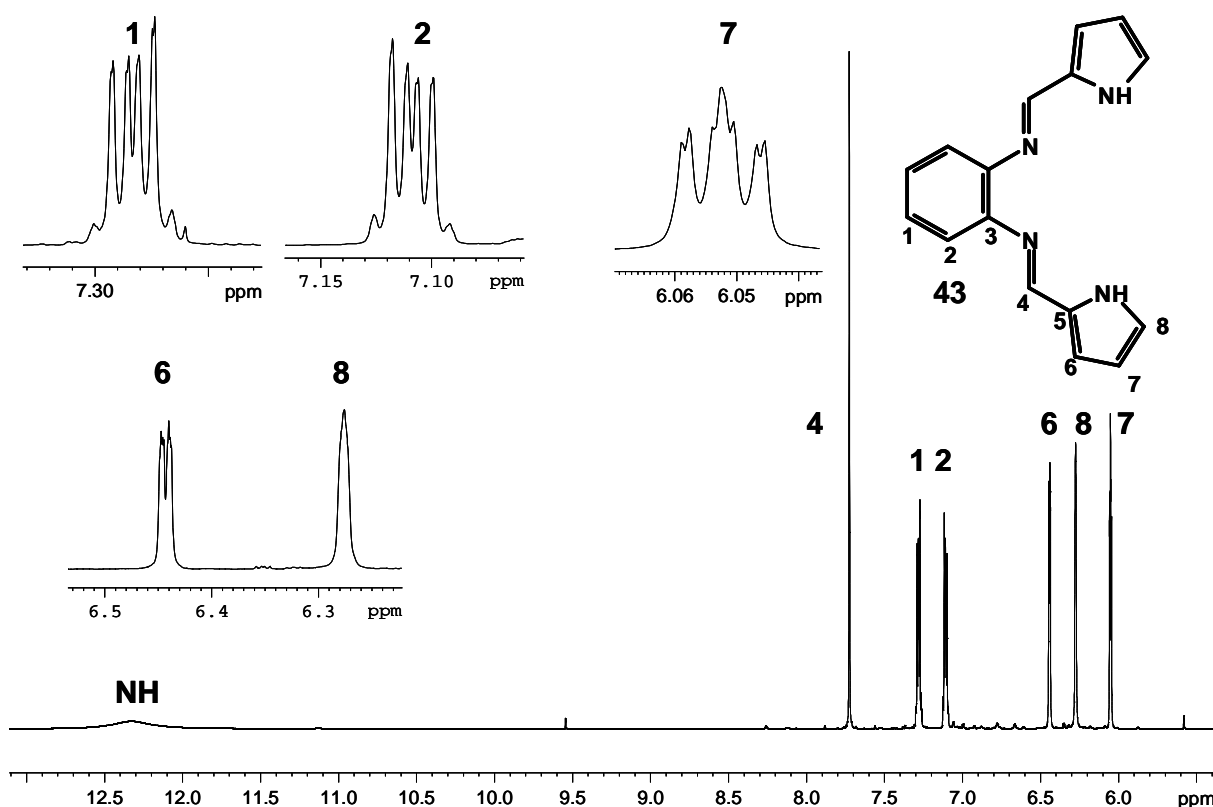
7.3.7.1 N,N'-Bis-[1-(1H-pyrrol-2-yl)-methyliden]-1,2-phenylendiamin^[46, 54]



In einem ausgeheizten und mit Argon begasten 250 mL-Zweihalskolben mit Schwanzhahn und Magnetrührstab wurden 3.40 g (32.0 mmol) 1,2-Phenylendiamin **21** und 6.02 g (64.0 mmol) Pyrrol-2-carbaldehyd in 60.0 mL absolutem Ethanol unter starkem Rühren gelöst. Dann wurde die leicht rote Lösung mit einer katalytischen Menge von 0.40 mL Eisessig versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fiel aus der Lösung ein gelber Feststoff **43** aus, dieser wurde unter Schutzgas über eine D3-Umkehrfritte abgetrennt, zweimal mit je 5 mL kaltem, absolutem Ethanol nachgewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Filtrat wurde bei Raumtemperatur weiter gerührt. Zunächst fiel noch etwas Feststoff aus, nach längerem Rühren (über Nacht) ging dieser jedoch wieder in Lösung. Die Lösung war tief schwarz.

Der gelbe Feststoff **43** erwies sich als das gewünschte Produkt und fiel laut NMR rein an, so dass auf ein Umkristallisieren aus Methanol verzichtet werden konnte.

Ausbeute an **43**: 3.18 g (12.0 mmol, 38 % Lit.^[54] 72 %, Zers. 170-180°C)

Abb. 76: ^1H -NMR von 43 in CDCl_3

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 12.38$ (br, 2 H, N-H), 7.72 (s, 2 H, 4-H), 7.27 (m, 2 H, 1-H), 7.13 (m, 2 H, 2-H), 6.43 (d, $^3J(6\text{-H}, 7\text{-H}) = 3.55 \text{ Hz}$, 2 H, 6-H), 6.31 (d, $^3J(8\text{-H}, 7\text{-H}) = 3.20 \text{ Hz}$; 2 H, 8-H), 6.02 (dt, $^3J(6\text{-H}, 7\text{-H}) = 3.55 \text{ Hz}$; $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 3.20 \text{ Hz}$, 2 H, 7-H).

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 150.74$ (4-C), 145.70 (3-C), 131.02 (5-C), 126.70 (2-C), 124.05 (7-C), 119.01 (1-C), 117.32 (6-C), 109.87 (8-C)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = 3127$ (s, $\nu(\text{NH-Pyrrol})$), 3085 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 1620 (s, $\nu(\text{C=N in Konjugation mit Ringsystem})$), 1575 (m, $\nu(\text{Aromat})$), 740 (s, $\nu(1,2\text{-Substitution})$)

MS (ESI, positiver Ionenmodus, Direkteinlass, 10 μM in Acetonitril): m/z : 263 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 285 $[\text{M}+\text{Na}^+]$, 326 $[\text{M}+\text{Na}^++\text{CH}_3\text{CN}]$; 547 $[2\text{M}+\text{Na}^+]$

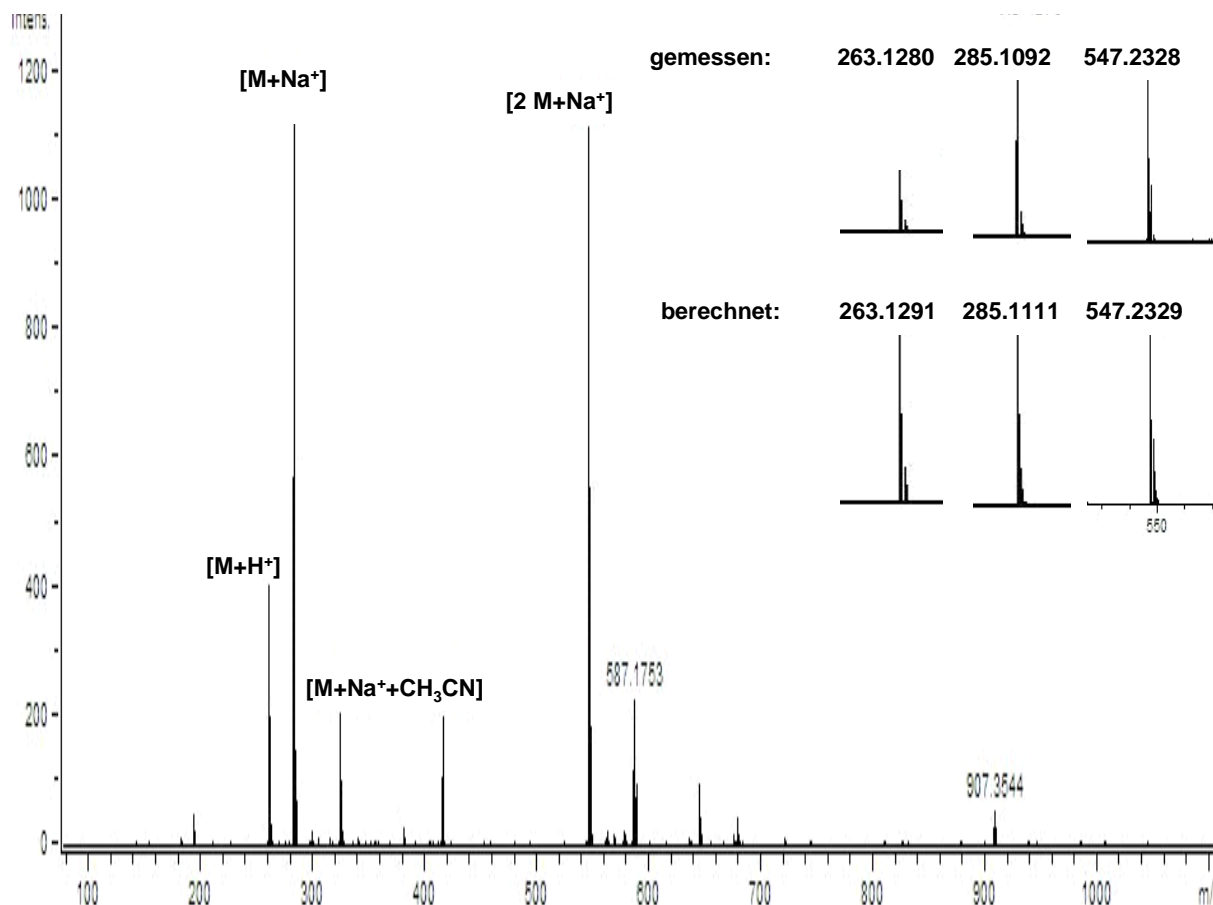


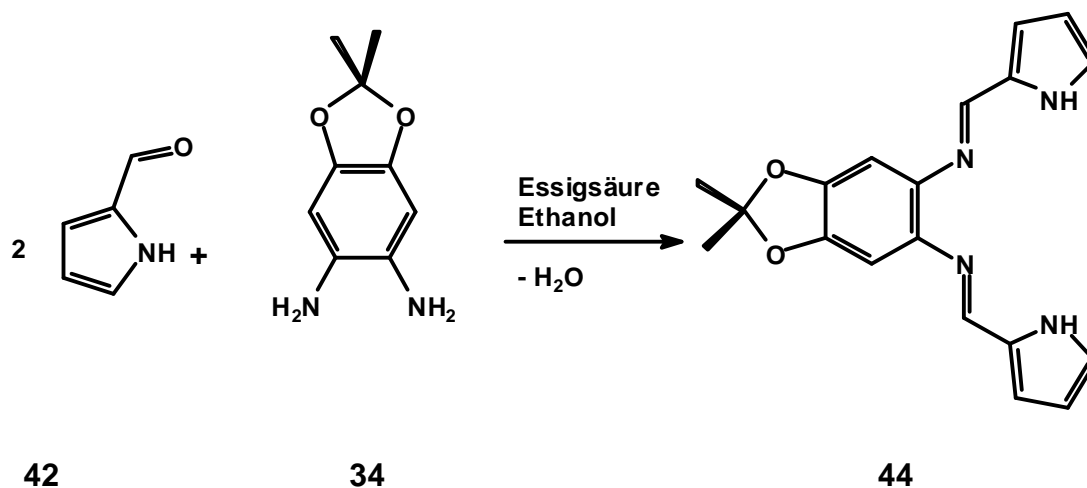
Abb. 77: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von 43

berechnet (für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4$ 43):	263.1291	$[\text{M} + \text{H}^+]$
gefunden :	263.1280	
Abweichung :	4.18 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{Na}$ 43):	285.1092	$[\text{M} + \text{Na}^+]$
gefunden :	285.1111	
Abweichung :	6.66 ppm	

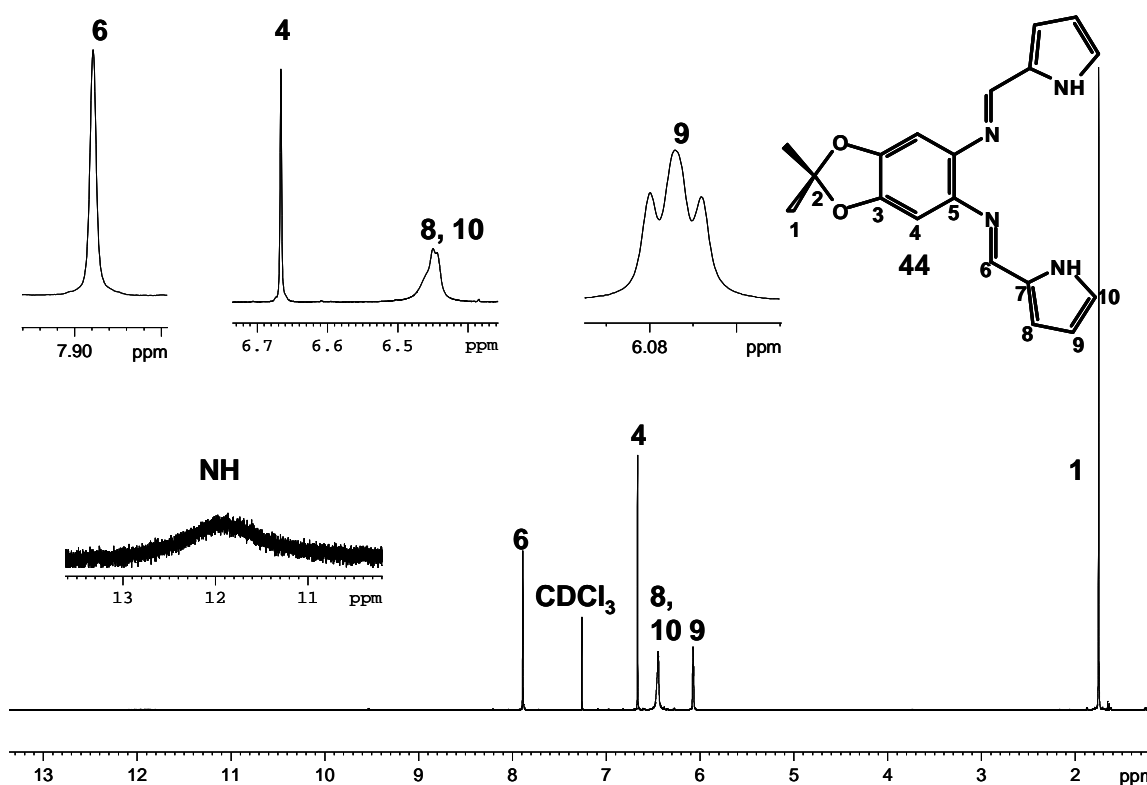
berechnet (für $\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{Na}$ 43):	547.2329	$[2\text{M} + \text{Na}^+]$
gefunden :	547.2328	
Abweichung :	0.18 ppm	

7.3.7.2 2,2-Dimethyl-N,N'-bis-[1-(1H-pyrrol-2-yl)-methyliden]-benzo[1,3]dioxol-5,6-diamin (Analog Lit.^[54])



In einem 25 mL Zweihalskolben mit Schwanzhahn wurden unter Argon 1.30 g (7.20 mmol) 2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxol-5,6-diamin **34** in 14.0 mL absolutem Ethanol gelöst und 1.40 g (3.60 mmol) fester Pyrrol-2-carbaldehyd **42** hinzugefügt. Nachdem beide Feststoffe vollständig gelöst waren, wurden unter Rühren 0.10 mL Eisessig als Katalysator zugesetzt. Die so gebildete rote Lösung wurde ca. 2 h gerührt und der entstandene gelbe Feststoff unter Schutzgas über eine D4-Umkehrfritte abgezogen und zweimal mit je 10 mL absolutem Ethanol nachgewaschen. Das Filtrat wurde weiter gerührt, es fiel jedoch kein weiterer Feststoff an. Der Feststoff **44** wurde zweimal mit je 10 mL heißem Methanol p.a. gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **44**: 1.05 g (3.14 mmol, 87 %, Zers. 190-200°C)

Abb. 78: ^1H -NMR von 44 in CDCl_3

Spektren: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 11.88$ (br s, 2H, N-H), 7.90 (s, 2H, 6-H), 6.68 (s, 2H, 4-H), 6.47 (dd, $^3J(8\text{-H}, 9\text{-H}) = 2.90 \text{ Hz}$; $^3J(10\text{-H}, 9\text{-H}) = 3.00 \text{ Hz}$, 4H, 8-H, 10-H), 6.09 (t, $^3J(8\text{-H}, 9\text{-H}) = 2.90 \text{ Hz}$; $^3J(10\text{-H}, 9\text{-H}) = 3.00 \text{ Hz}$, 2H, 9-H), 1.76 (s, 6H, 1-H)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 148.58$ (6-C), 146.65 (3-C), 138.53 (5-C), 131.03 (7-C), 124.05 (9-C), 119.49 (2-C), 117.32 (8-C), 110.11 (10-C), 99.29 (4-C), 26.44 (1-C)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = 3127$ (s, $\nu(\text{NH-Pyrrol})$), 3085 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 1620 (s, $\nu(\text{C=N in Konjugation mit Ringsystem})$), 1575 (m, $\nu(\text{Aromat})$), 740 (s, $\nu(1,2\text{-Substitution})$)

Elementaranalyse: $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$ [334.4]

berechnet	C 68.25 %	H 5.43 %	N 16.76 %
gefunden	C 68.03 %	H 5.15 %	N 16.63 %

MS (ESI, positiver Ionenmodus, Direkteinlass, 10 μ M in Acetonitril): m/z : 335 $[M+H^+]$, 357 $[M+Na^+]$, 669 $[2M+H^+]$, 691 $[2M+Na^+]$

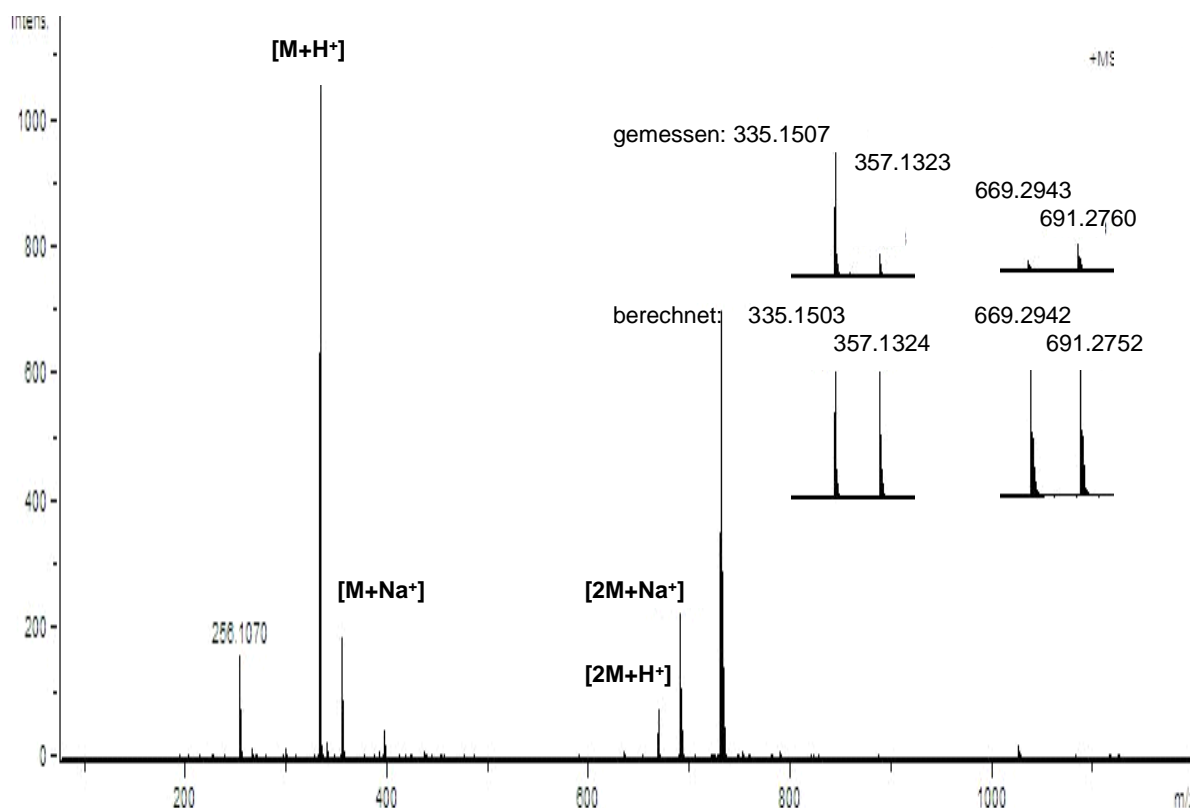
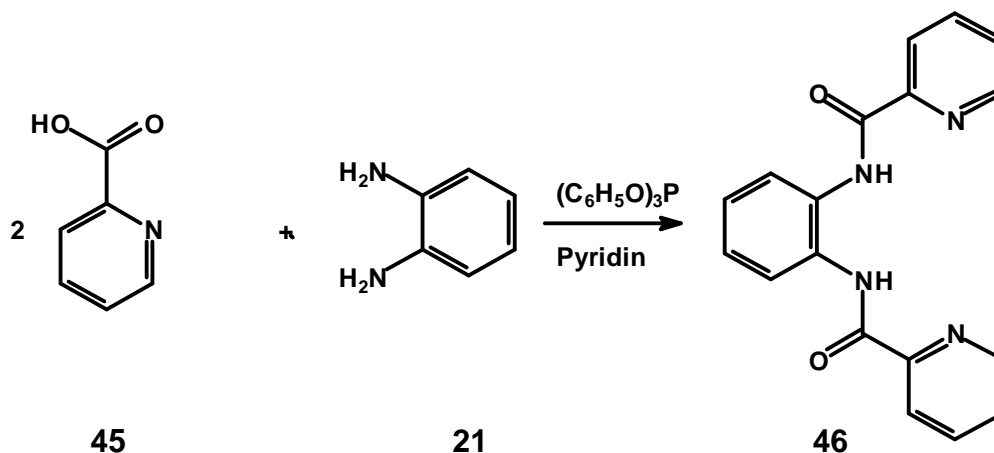


Abb. 79: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von 44

berechnet (für $C_{19}H_{19}N_4O_2$ 44):	335.1503	$[M + H^+]$
gefunden :	335.1507	
Abweichung :	1.19 ppm	
berechnet (für $C_{19}H_{18}N_4O_2Na$ 44):	357.1324	$[M + Na^+]$
gefunden :	357.1323	
Abweichung :	0.28 ppm	
berechnet (für $C_{38}H_{37}N_8O_4$ 44):	669.2942	$[2M + H^+]$
gefunden :	669.2943	
Abweichung :	0.15 ppm	
berechnet (für $C_{38}H_{36}N_8O_4Na$ 44):	691.2752	$[2M + Na^+]$
gefunden :	691.2760	
Abweichung :	1.16 ppm	

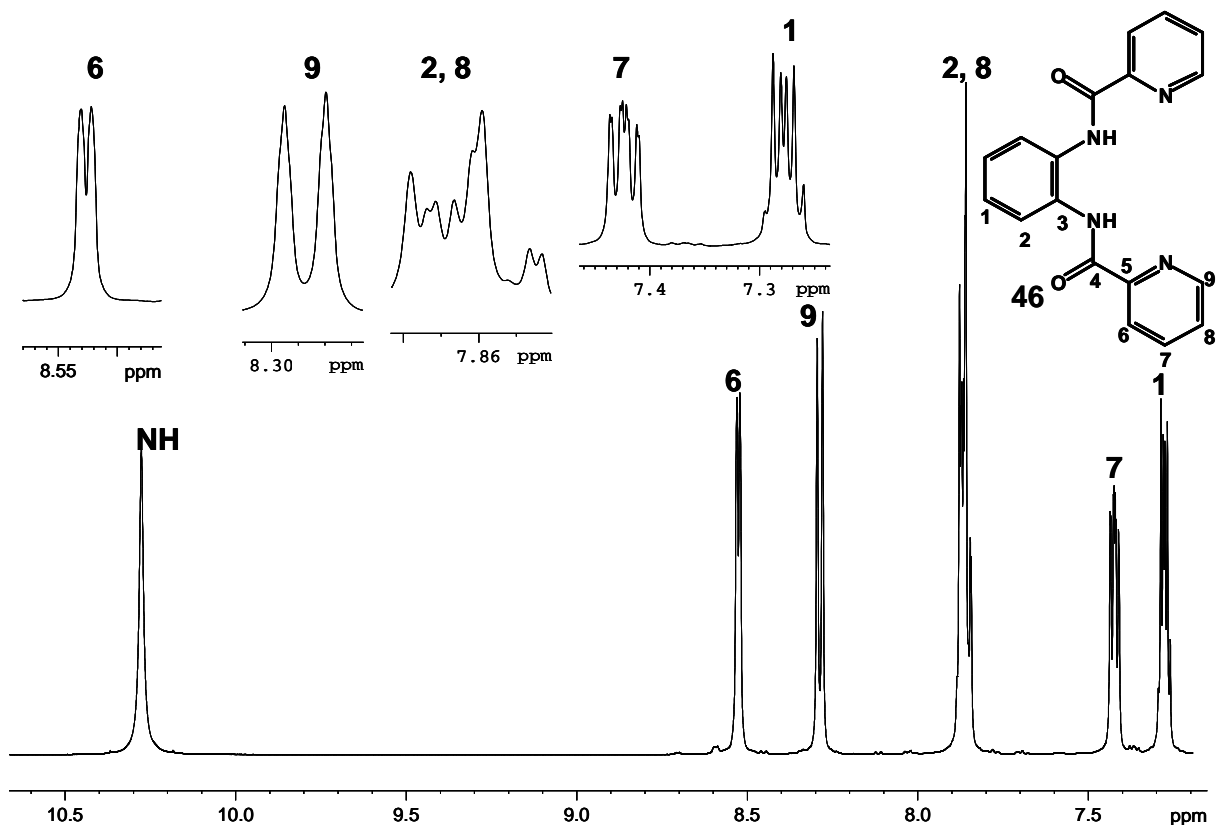
7.3.8 Picolinsäureamid-Liganden

7.3.8.1 1,2-Bis(2-picolinsäureamido)-benzen^[62]



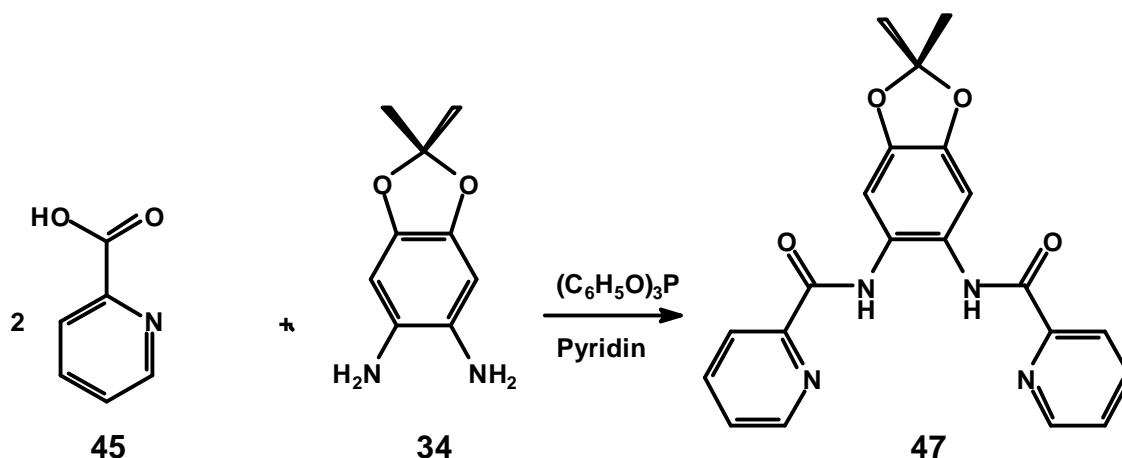
Zu einer Lösung von 7.38 g (60.0 mmol) 2-Pyridincarbonsäure **45** in 24 mL trockenem Pyridin wurde eine Lösung von 3.24 g (30.0 mmol) 1,2-Phenylendiamin **21** in 6 mL trockenem Pyridin zugetropft. Die Lösung wurde auf 100°C erhitzt und in der Hitze 15.7 mL (18.6 g; 60.0 mmol) Triphenylphosphit hinzugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch weitere 4 h bei 100°C gekocht und über Nacht abkühlen gelassen. Der dabei entstandene gelbe Niederschlag wurde unter Schutzgas abgezogen und dreimal mit einer kleinen Menge kaltem Chloroform gewaschen. Der erhaltene leichtgelbe Feststoff **46** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und analysiert.

Ausbeute an **46**: 5.10 g (15.71 mmol, 52 % Lit.^[62] 96 %, Schmp. 150-153°C)

Abb. 80: ^1H -NMR von 46 in CDCl_3

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 10.27$ (s, 2H, NH); 8.52 (d, $^3J(6\text{-H}, 7\text{-H}) = 4.40$ Hz, 2 H, 6-H); 8.28 (dd, $^3J(9\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.80$ Hz, $^4J(7\text{-H}, 9\text{-H}) = 1.00$ Hz, 2 H, 9-H); 7.89 (m, 4 H, 2-H, 8-H); 7.42 (dt, $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.52$ Hz, $^3J(7\text{-H}, 6\text{-H}) = 4.40$ Hz, $^4J(7\text{-H}, 9\text{-H}) = 1.00$ Hz, 2 H, 7-H); 7.28 (m, 2 H, 1-H)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 163.03$ (4-C); 149.69 (3-C); 148.26 (5-C); 137.57 (9-C); 130.25 (6-C); 129.46 (8-C); 126.57 (7-C); 126.24 (2-C); 122.61 (1-C)

7.3.8.2 5,6-Bis(2-picolinsäureamido)-benz-1,3-dioxol (Analog Lit.^[62])

Analog zur Synthese des 1,2-Bis(2-picolinsäureamido)-benzen-Liganden **46** wurde auch das 5,6-Bis(2-picolinsäureamido)-benz-1,3-dioxol **47** dargestellt. In einem ausgeheizten 50 mL Dreihalskolben wurde unter Schutzgas zu einer Suspension von 2.10 g (17.1 mmol) 2-Pyridin-carbonsäure **45** in 7 mL trockenem Pyridin eine Lösung von 1.50 g (8.32 mmol) 2,2-Dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin **34** in 2 mL trockenem Pyridin hinzuge tropft, auf 100°C erhitzt und in der Hitze mit 5.30 g (4.50 mL, 18.3 mmol) Triphenylphosphit versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch weitere 4 h bei 100°C gekocht und über Nacht abkühlen gelassen. Der dabei entstandene gelbe Niederschlag **47** wurde unter Schutzgas abgezogen und dreimal mit einer kleinen Menge kaltem Chloroform gewaschen. Der erhaltene leichtgelbe Feststoff **47** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und analysiert.

Ausbeute an **47**: 2.05 g (5.20 mmol, 63 %, Schmp. 210°C)

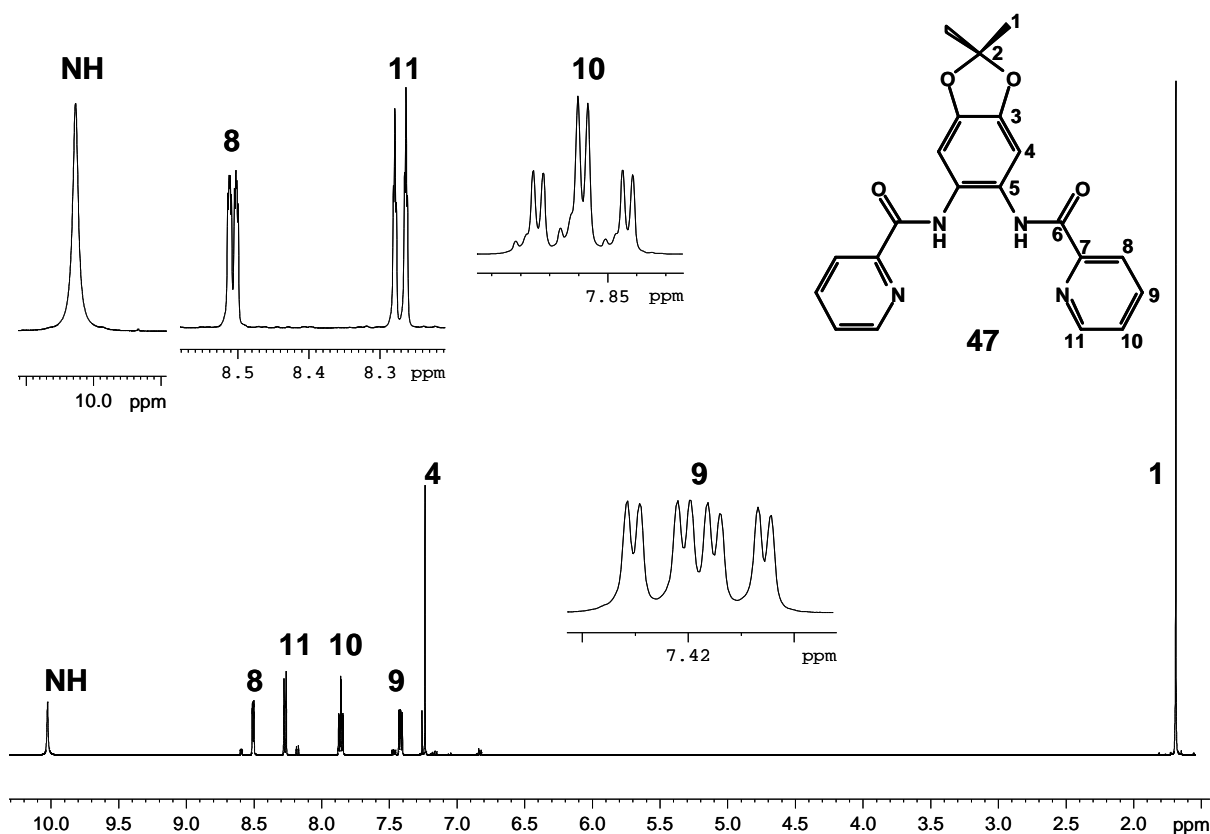


Abb. 81: ^1H -NMR von 47 in CDCl_3

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 10.10$ (s, 2H, N-H), 8.51 (dd, $^3J(8\text{-H}, 9\text{-H}) = 4.75$ Hz, $^4J(8\text{-H}, 10\text{-H}) = 1.00$ Hz, 2H, 8-H), 8.26 (dd, $^3J(11\text{-H}, 10\text{-H}) = 7.85$ Hz, $^4J(11\text{-H}, 9\text{-H}) = 1.15$ Hz, 2H, 11-H), 7.86 (dt, $^3J(11\text{-H}, 10\text{-H}) = 7.85$ Hz, $^3J(9\text{-H}, 10\text{-H}) = 7.72$ Hz, $^4J(8\text{-H}, 10\text{-H}) = 1.00$ Hz, 2H, 10-H), 7.42 (ddd, $^3J(9\text{-H}, 10\text{-H}) = 7.72$ Hz, $^3J(8\text{-H}, 9\text{-H}) = 4.75$ Hz, $^4J(11\text{-H}, 9\text{-H}) = 1.15$ Hz, 2H, 9-H), 7.24 (s, 2H, 4-H), 1.69 (s, 6H, 1-H).

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 162.93$ (6-C), 149.81 (3-C), 148.26 (8-C), 145.71 (5-C), 137.55 (10-C), 126.96 (9-C), 123.71 (7-C), 122.59 (11-C), 119.19 (2-C), 105.34 (4-C), 26.03 (1-C)

IR (KBr):

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3364, 3335, 3065$ (w, $\nu(\text{NH-Amid})$), 3065 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 2984, 2929 (w, $\nu(\text{CH}_3)$), 1685, 1667 (s, $\nu(\text{CONH in Konjugation mit Ringsystem})$), 1590, 1569 (m, $\nu(\text{Aromat})$), 1520 (s, $\nu(\text{Amid})$), 1266, 1219, 1182 (w, $\nu(\text{C-O})$), 745 (m, $\nu(1,2,4,5\text{-Substitution})$)

MS (ESI, positiver Ionenmodus, Direkteinlass, 10 μM in Acetonitril): m/z : 391 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 413 $[\text{M}+\text{Na}^+]$, 803 $[2\text{M}+\text{Na}^+]$

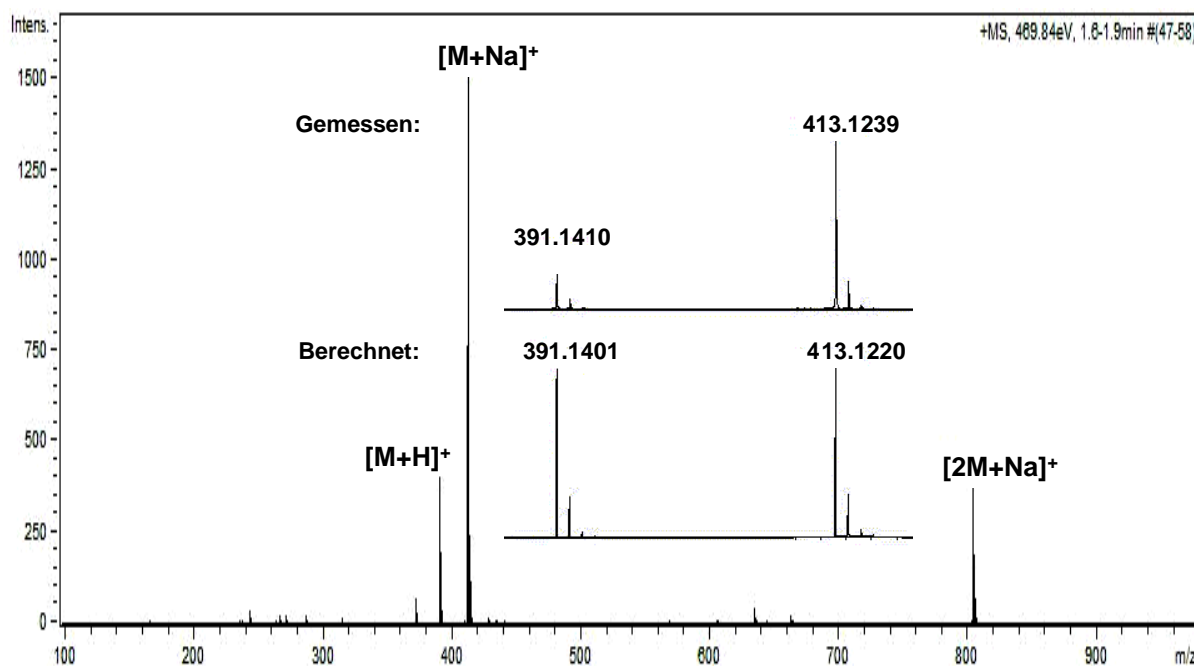


Abb. 82: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von 47

berechnet (für $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_4$ 47):	391.1401	$[\text{M} + \text{H}^+]$
gefunden :	391.1410	
Abweichung :	2.30 ppm	

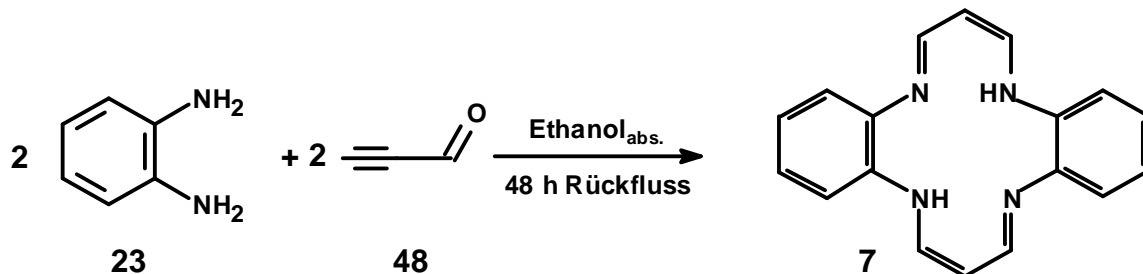
berechnet (für $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ 47):	413.1220	$[\text{M} + \text{Na}^+]$
gefunden :	413.1239	
Abweichung :	4.60 ppm	

Elementaranalyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$ [390.4]

Berechnet:	C 64.61 %	H 4.65 %	N 14.35 %
Gefunden:	C 64.79 %	H 4.61 %	N 14.06 %

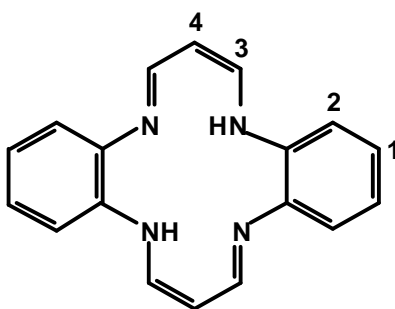
7.3.9 TAA-Liganden

7.3.9.1 5,14-Dihydro-dibenzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen^[32]



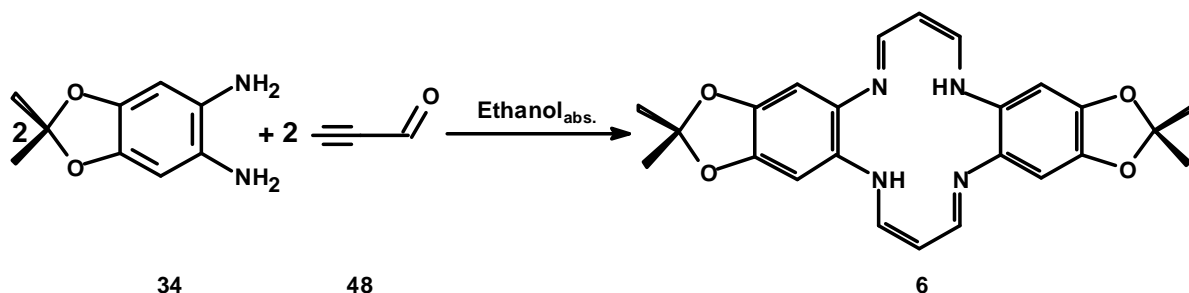
Eine Lösung von 4.59 g (42.4 mmol) 1,2-Phenylendiamin **23** in 60 mL Ethanol_{abs.} wurde in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Magnetrührer, Tropftrichter und Hahn zum Einleiten von Argon vorgelegt. Bei 40°C und unter Argonatmosphäre wurden langsam 2.29 g (42.4 mmol) Propinal **48** in 2 mL Ethanol_{abs.} zugetropft. Anschließend wurde 48 h unter Rückfluss gerührt. Der entstandene dunkel rotbraune Feststoff **7** wurde abfiltriert, mit viel Ethanol gewaschen und im Vakuum über Calciumchlorid getrocknet. Die Reaktionslösung wurde durch Abkondensieren des Lösemittels eingeeengt und das dabei ausfallende Produkt wurde wie oben beschrieben gereinigt.

Ausbeute an **7**: 0.894 g (3.10 mmol, 14.6 %, Lit. ^[32]30 %)



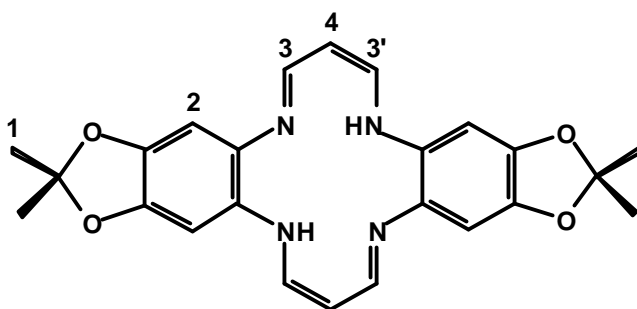
¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ[ppm]= 13.75 (t, ³J(NH, 3-H) = 6.1 Hz, 2H, NH); 7.66 (dd, ³J(NH, 3-H) = 6.2 Hz, ³J(4-H, 3-H) = 6.2 Hz; 4H, 3-H); 7.04 (m, 2-H); 6.91 (m, 1-H); 5.29 (t, ³J(3-H, 4-H) = 6.2 Hz, 2H, 4-H)

7.3.9.2 2,2,12,12-Tetramethyl-5,14-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]-benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen

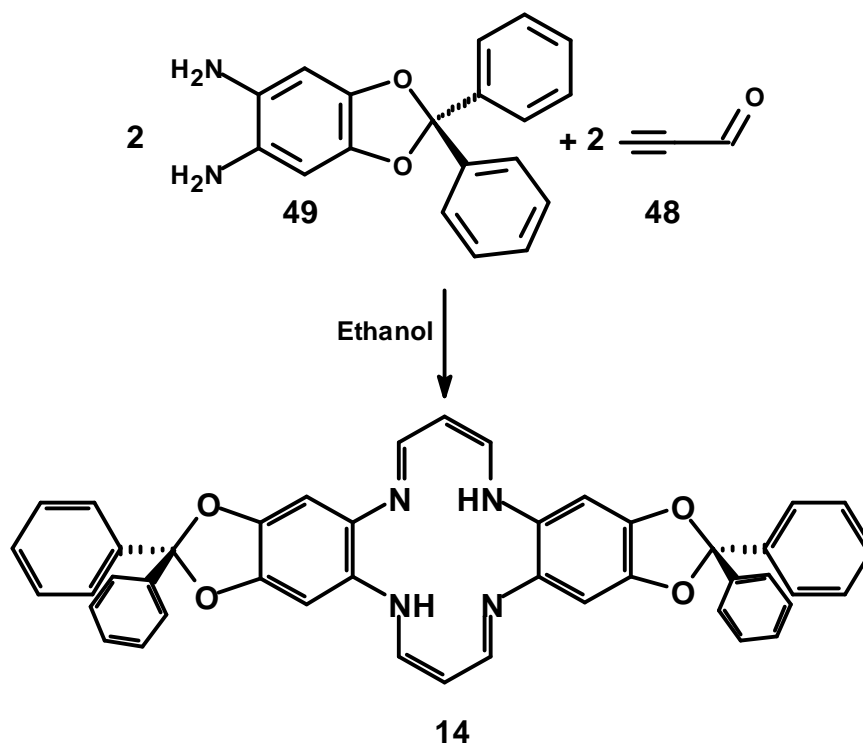


Eine Lösung von 11.3 g (62.5 mmol) 2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxol-5,6-diamin **34** in 150 mL mit Argon gesättigtem Ethanol_{abs.} wurde in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Magnetrührer, Tropftrichter und Hahn zum Einleiten von Argon vorgelegt. Bei 40°C und unter Argonatmosphäre wurden langsam 3.38 g (62.5 mmol) Propinal **48** in 10 mL Ethanol_{abs.} zugetropft. Anschließend wurde 4 h unter Rückfluss gerührt. Der entstandene dunkel rotbraune Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Reaktionslösung wurde durch Abkondensieren des Lösemittels eingeeengt und das dabei ausfallende Produkt wurde wie oben beschrieben gereinigt.

Ausbeute an **6**: 4.83 g (11.2 mmol, Schmp. 273°C Lit.^[30] 274°C, 36 %)

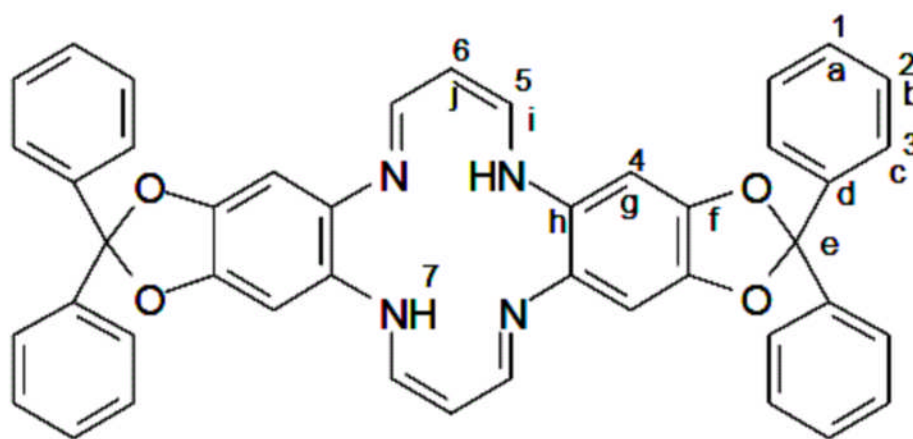


¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ[ppm]= 1.62 (s, 12 H, 1-H); 4.77 (t, ³J {(4-H, 3-H), (4-H, 3'-H)} = 6.3 Hz, 2 H, 4-H); 6.38 (s, 4 H, 2-H); 7.26 (dd, ³J {(3-H, 4-H), (3'-H, 4-H)} = 6.3 Hz, ³J {(3-H, NH), (3'-H, NH)} = 6.3 Hz, 4 H, 3-H, 3'-H); 14.21 (t, ³J {(5-H, 3-H), (5-H, 3'-H)} = 6.3 Hz, 2 H, NH)

7.3.9.3 2,2,12,12-Tetraphenyl-5,15-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]-benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen

Eine Lösung von 8.00 g (26.3 mmol) 2,2-Diphenyl-1,3-benzodioxol-5,6-diamin **49** in 450 mL mit Argon gesättigtem Ethanol_{abs.} wurde in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Magnetrührer, Tropftrichter und Hahn zum Einleiten von Argon vorgelegt. Bei 50°C und unter Argonatmosphäre wurden schnell 1.50 g (27.7 mmol) Propinal **48** in 1.50 mL Ethanol_{abs.} zugetropft. Anschließend wurde 72 h unter Rückfluss gerührt. Der entstandene dunkel rotbraune Feststoff **14** wurde abfiltriert, mit kaltem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute an **14**: 3.73 g (5.34 mmol, 42 %, Lit. 41 %)

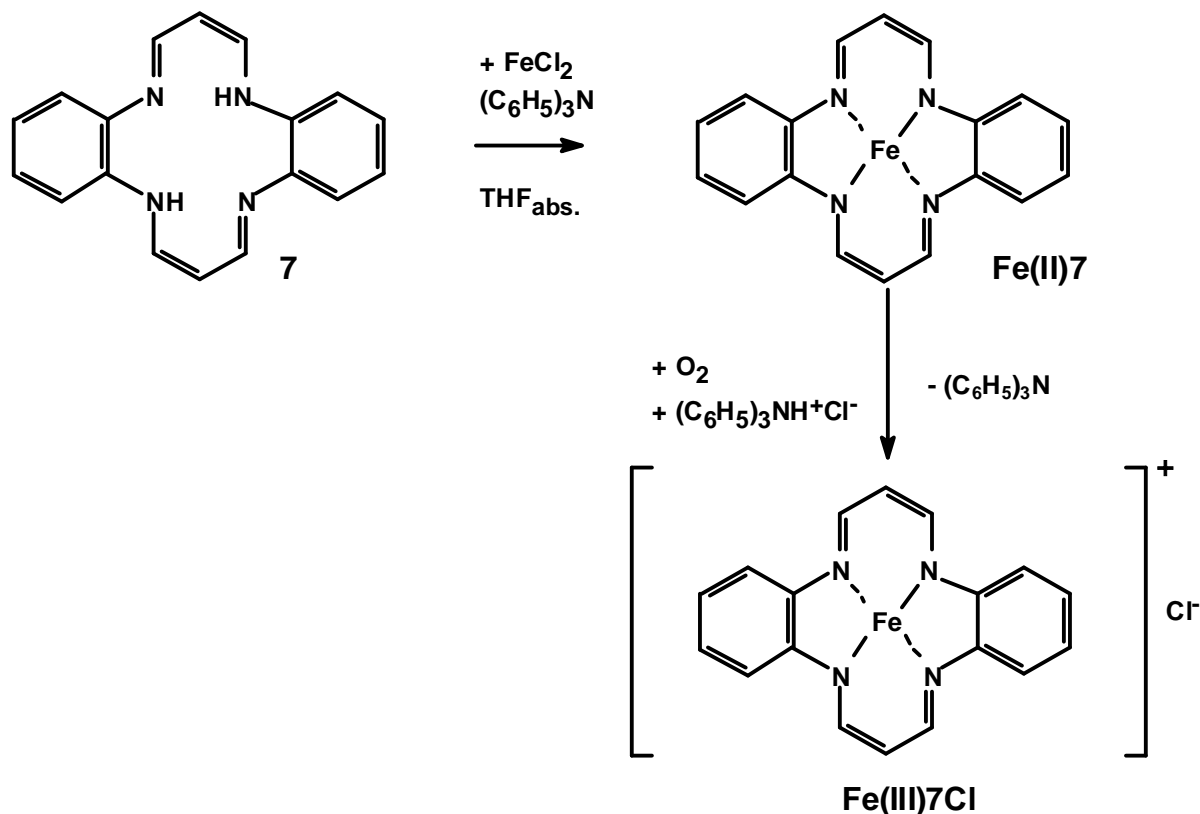


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 14.12$ (t, $^3J\{\text{H-7}, \text{H-5}\} = 6.3 \text{ Hz}$, H-7, 2 H); 7.53 – 7.32 (m, H-3, H-2, H-1, 20 H); 7.25 (dd, $^3J\{\text{H-5}, \text{H-7}\} = 6.3 \text{ Hz}$, $^3J\{\text{H-5}, \text{H-6}\} = 6.3 \text{ Hz}$, H-5, 4 H); 6.51 (s, H-4, 4 H); 4.77 (t, $^3J\{\text{H-6}, \text{H-5}\} = 6.3 \text{ Hz}$, H-6, 2 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 144.67$ (i); 144.57 (f); 140.10 (d); 132.27 (h); 129.13 (a); 128.26 (c); 126.30 (b); 116.96 (e); 95.90 (j); 94.87 (g)

7.3.10 Darstellung der Eisen(III)-komplexe

7.3.10.1 Eisen(III)-dibenzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]-annulen-chlorid ^[30, 44]



In einem Kolben mit Hahn zum Einleiten von Argon und Tropftrichter wurden unter Schutzgas 76.0 mg (0.60 mmol) Eisen(II)chlorid und 370.0 mg (1.51 mmol) Triphenylamin in 5 mL $\text{THF}_{\text{abs.}}$ über Nacht gerührt und so vorgelöst. Anschließend wurden 157.0 mg (0.54 mmol) 5,14-Dihydro-dibenzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen **7** in 12 mL $\text{THF}_{\text{abs.}}$ gelöst und bei 60 °C langsam zu der gelben Lösung zugetropft. Die Lösung wurde nach beendeter Zugabe weitere 30 min bei 60°C gerührt. Die über der abgekühlten Lösung vorhandene Argonatmosphäre wurde mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Reaktionsmischung unter Luftatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene schwarze, feinkristalline Niederschlag **Fe(III)7Cl** wurde abfiltriert und mit 2-3 mL THF gewaschen. Es wurde darauf geachtet keine Luft direkt durch den Niederschlag zu saugen. Das erhaltene Produkt wurde unter Vakuum getrocknet. Durch mehrtägiges Behandeln der Substanz bei 80°C im Wasserbad an der Vakuumpumpe wurde versucht, noch verbleibendes THF vollständig zu entfernen. Die Ergebnisse der

Eisenanalyse lassen darauf schließen, dass im schwarzen Pulver **Fe(III)7Cl** immer noch ein Molekül THF enthalten ist.

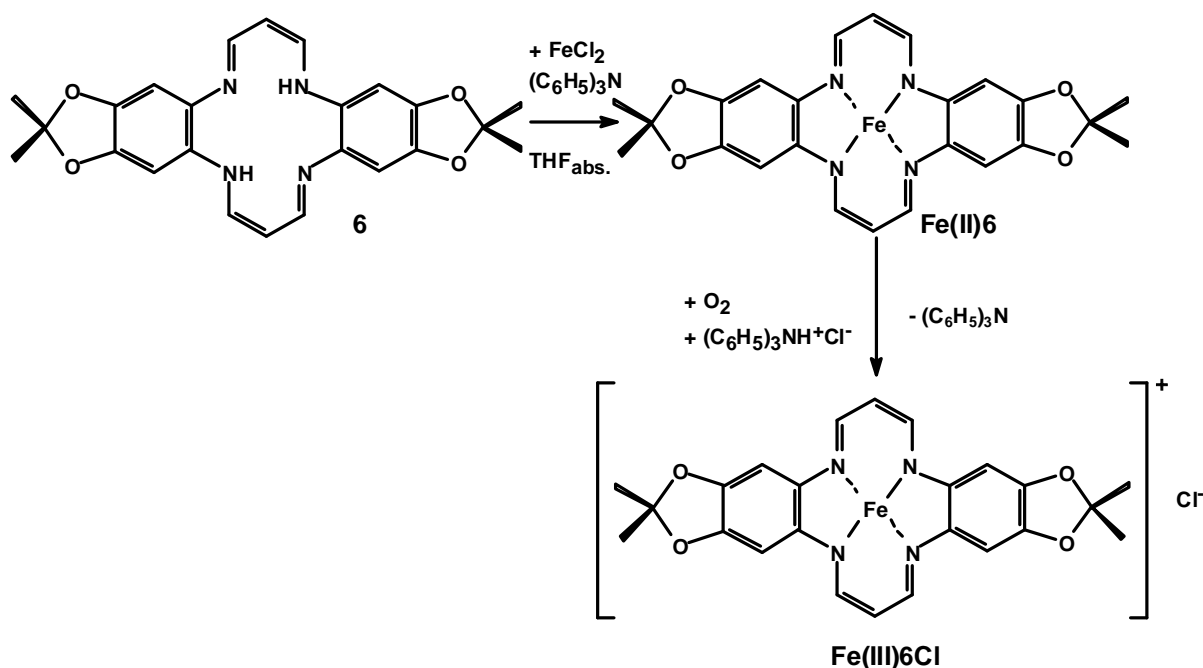
Ausbeute an **Fe(III)7Cl**: 177 mg (0.39 mmol, 72 % Lit.^[30]:90 %)

Charakterisierung des Produktes:

Fe(III)7Cl THF

Fe gefunden (%)	Berechnet (%)
12.48	12.42

7.3.10.2 Eisen(III)-2,2,12,12-tetramethyl-5,14-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]-benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen-chlorid



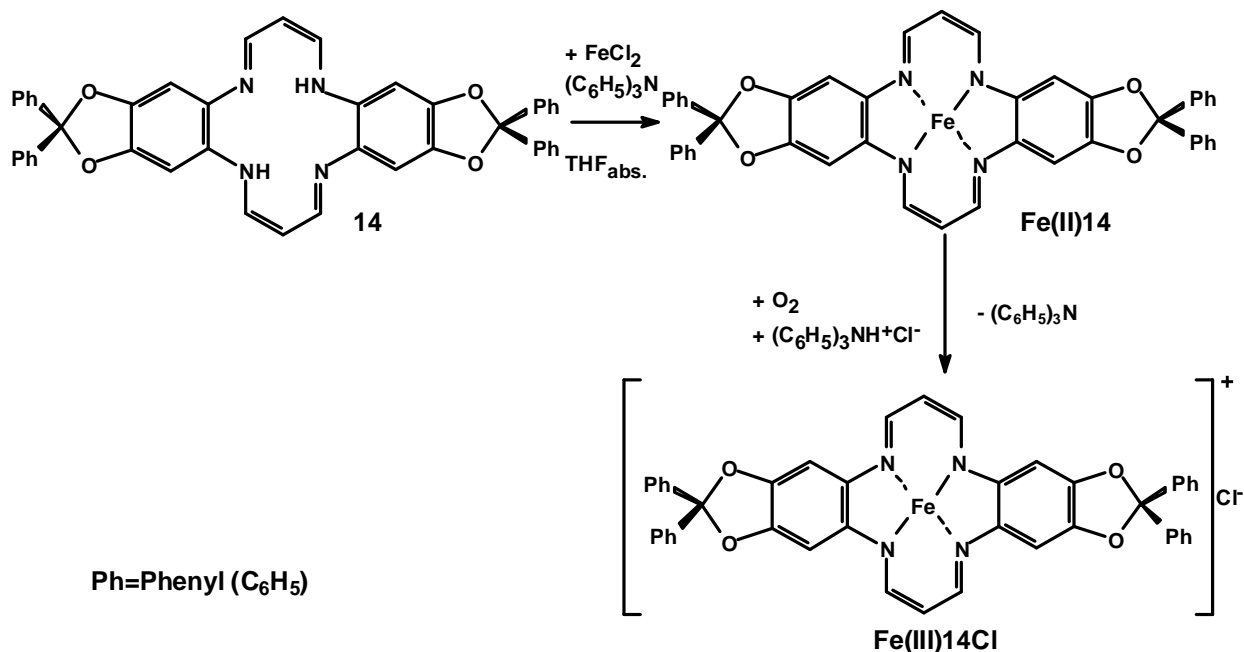
In einem Kolben mit Hahn zum Einleiten von Argon und Tropftrichter wurden 64.4 mg (0.50 mmol) Eisen(II)chlorid und 373.0 mg (1.52 mmol) Triphenylamin über Nacht in 5 mL THF (abs.) unter Argon gerührt. Die braune trübe Lösung wurde auf 60°C erhitzt und eine Lösung von 209.5mg (0.48 mmol) 2,2,12,12-Tetramethyl-5,14-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]-benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen **6** in 10 mL THF (abs.) innerhalb von 5 min hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei 60°C gerührt. Dann wurde das Argon mittels Wasserstrahlpumpe abgezogen und die Reaktionslösung an der Luft bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der ausgefallene schwarze Niederschlag **Fe(III)6Cl** wurde unter Schutzgas über eine D4 Umkehrfritte abfiltriert, zweimal mit je 2 mL THF (abs.) nachgewaschen und im Ölpumpenvakuum bei 60°C getrocknet.

Ausbeute an **Fe(III)6Cl**: 228.6 mg (0.44 mmol, 92 %)

MS (ESI, positiver Ionenmodus, Direkteinlass, 10 μM in Acetonitril): m/z : $[\text{M}]^+$ 521

Elementaranalyse: Fe gefunden:	10.40%
Fe berechnet	10.70%

7.3.10.3 Eisen(III)-2,2,12,12-tetraphenyl-5,14-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]-benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen-chlorid

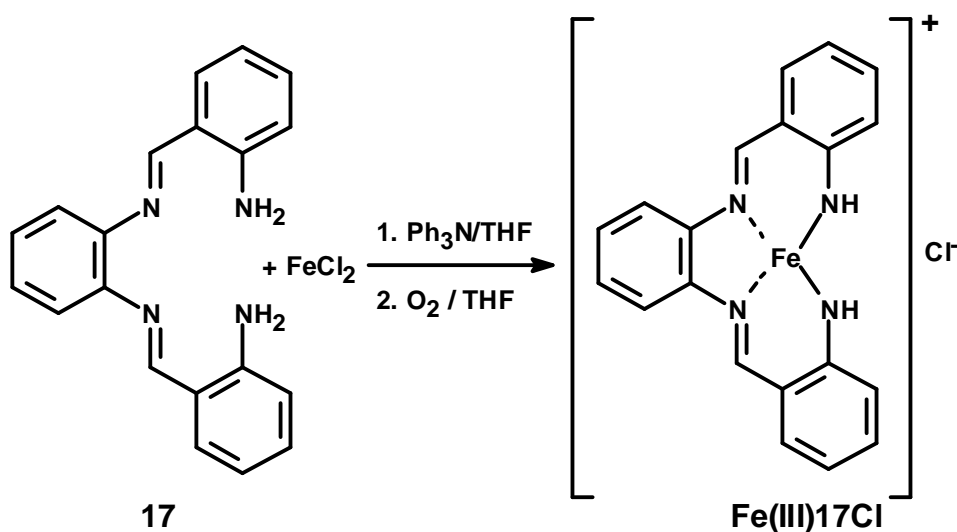


In einem Kolben mit Hahn zum Einleiten von Argon und Tropftrichter wurden 44.6 mg (0.35 mmol) Eisen(II)chlorid und 249.6 mg (1.02 mmol) Triphenylamin über Nacht in 5 mL THF (abs.) unter Argon gerührt. Die braune trübe Lösung wurde auf 60°C erhitzt und eine Lösung von 226.1 mg (0.33 mmol) 2,2,12,12-Tetraphenyl-5,14-dihydro-di-[1,3]-dioxolo-[4',5':4,5]-benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza[14]annulen **14** in 10 mL THF (abs.) innerhalb von 5 min hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei 60°C gerührt. Dann wurde das Argon mittel Wasserstrahlpumpe abgezogen und die Reaktionslösung an der Luft bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der ausgefallene schwarze Niederschlag **Fe(III)14Cl** wurde unter Schutzgas über eine D4 Umkehrfritte abfiltriert, zweimal mit je 2 mL THF (abs.) nachgewaschen und im Ölpumpenvakuum bei 60°C getrocknet.

Ausbeute an **Fe(III)14Cl**: 46.7 mg (61.0 μmol , 18%)

Elementaranalyse: Fe gefunden:	6.98 %
Fe berechnet	7.25 %

7.3.10.4 N,N'-Bis-(2'-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamineisen(III)-chlorid



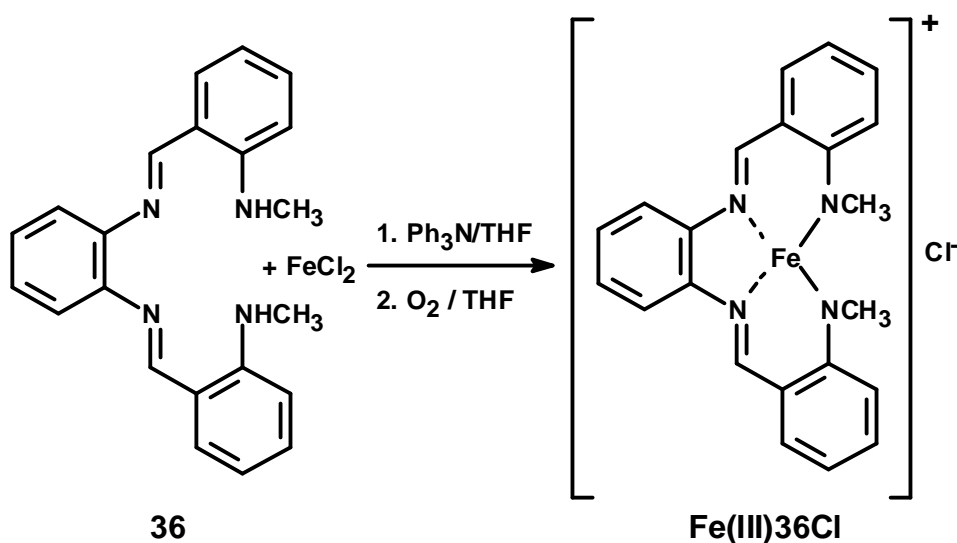
In einem 50mL-Dreihalskolben mit Hahn zum Einleiten von Argon und Tropftrichter wurden 46.5 mg (0.35 mmol) Eisen(II)chlorid und 260.0 mg (1.02 mmol) Triphenylamin über Nacht in 5 mL THF (abs.) unter Argon gerührt. Die braune trübe Lösung wurde auf 60°C erhitzt und eine Lösung von 107.7 mg (0.34 mmol) N,N'-Bis-(2'-aminobenzyliden)-1,2-phenylendiamin **17** in 10 mL THF (abs.) innerhalb von 5 min hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei 60°C gerührt. Dann wurde das Argon mittels Wasserstrahlpumpe abgezogen und die Reaktionslösung an der Luft bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde vollständig abkondensiert in 5 mL n-Hexan aufgenommen und 1 h gerührt. Anschließend wurde der ungelöste Feststoff **Fe(III)17Cl** abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **Fe(III)17Cl**: 43.6 mg (0.11 mmol, 32 %)

Tab. 10: Elementaranalyse von **Fe(III)17Cl**

Element	% Fe	% C	% H
Berechnet	13.83	54.63	4.58
Gefunden	13.63	54.25	4.70

7.3.10.5 N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]- 2,2-dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamineisen(III)-chlorid



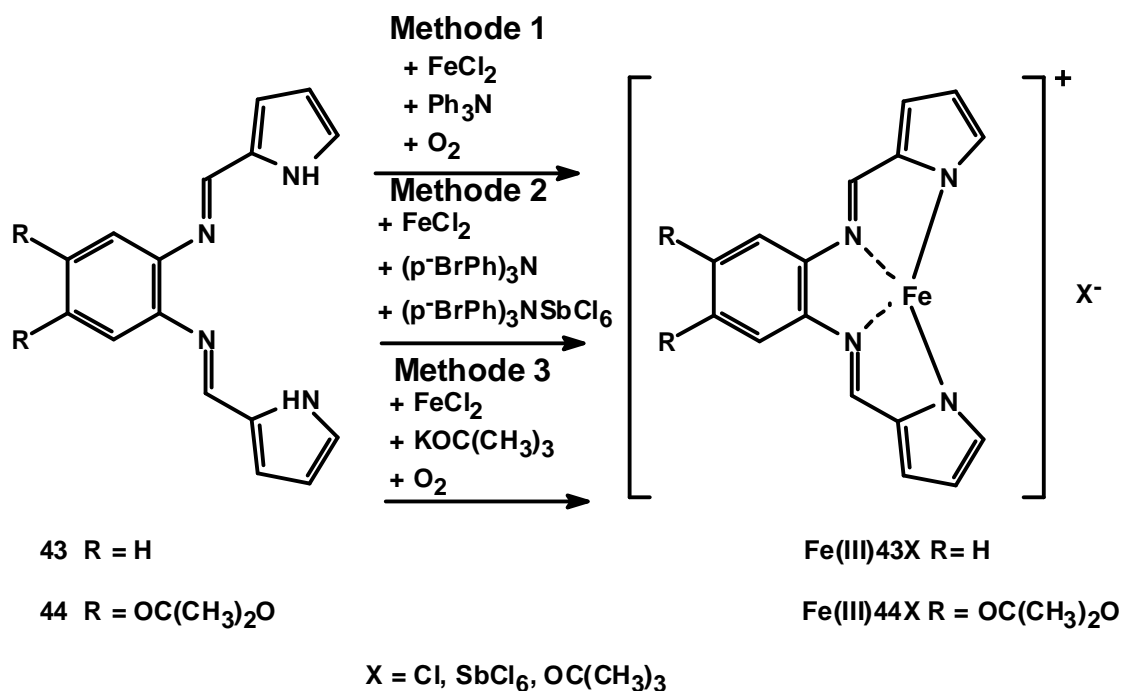
In einem 100mL-Dreihalskolben mit Hahn zum Einleiten von Argon und Tropftrichter wurden 85.5 mg (0.68 mmol) Eisen(II)chlorid und 501.4 mg (2.04 mmol) Triphenylamin wurden über Nacht in 7 mL THF (abs.) unter Argon gerührt. Die braune trübe Lösung wurde auf 60°C erhitzt und eine Lösung von 201.1 mg (0.59 mmol) N,N'-Bis-[2'-(methylamino)benzyliden]- 2,2-dimethyl-1,3-benzdioxol-5,6-diamin **36** in 20 mL THF (abs.) innerhalb von 5 min hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei 60°C gerührt. Dann wurde das Argon mittels Wasserstrahlpumpe abgezogen und die Reaktionslösung an der Luft bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der ausgefallene schwarz-braune Feststoff wurde über eine D3-Fritte unter Schutzgas abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Feststoff enthielt noch ein Molekül THF.

Ausbeute an **Fe(III)36Cl THF**: 60.4 mg (0.14 mmol, 20 %)

Tab. 11: Elementaranalyse von Fe(III)36Cl THF

	% Fe	% C	% H	% N
Gefunden	10.86	62.79	5.40	11.29
Berechnet	11.08	61.98	5.60	11.12

7.3.10.6 Komplexierung der Pyrrol - Liganden



Es wurden drei verschiedene Methoden zur Komplexierung der Liganden ausprobiert:

Methode 1(Analog Lit.^[30, 44]):

64.4 mg (0.51 mmol) Eisen(II)chlorid wurden unter Schutzgas mit 373.0 mg (1.52 mmol) Triphenylamin in 5 mL absolutem THF über Nacht gerührt. Die dabei entstandene braune Suspension wurde auf 60°C erhitzt und innerhalb von 5 min mit einer Lösung von 0.484 mmol des Liganden in 10 mL absolutem THF versetzt. Die Lösung wurde nach beendeter Zugabe weitere 30 min bei 60°C gerührt. Die über der abgekühlten Lösung vorhandene Argonatmosphäre wurde mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Reaktionsmischung unter Luftatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf das halbe Volumen eingeeengt. Der dabei ausgefallene schwarze Niederschlag wurde unter Schutzgas abgesaugt, mit wenig kaltem, absolutem THF gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Methode 2 (Analog Lit.^[44]):

58.7 mg (0.46 mmol) Eisen(II)-chlorid wurden unter Schutzgas in 5.0 mL absolutem THF über Nacht gelöst. Alle weiteren Arbeiten wurden ebenfalls unter Schutzgas durchgeführt. Es wurden 529.7 mg (1.08 mmol) Tris(p-brom-phenyl)amin zugegeben und auf 60°C erhitzt. Zu dieser dunkelbraunen Lösung wurden innerhalb von 5 min 0.36 mmol Ligand, gelöst in 8.0 mL absolutem THF, hinzugetropft. Die Reaktionsmischung wurde nach beendeter Zugabe weitere 45 min bei 60°C gerührt. Bei dieser Temperatur wurden anschließend 378.0 mg (0.465 mmol) Tris(p-bromphenyl)aminiumhexachloroantimonat frisch in 2 mL DMSO/THF (1:1 v/v) gelöst und innerhalb von 2 min bei 60°C schnell zugetropft und weitere 20 min gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, auf das halbe Volumen eingeeengt und der entstandene braune Niederschlag unter Argon über eine D4 Fritte abfiltriert, mit 1.0 mL absolutem THF gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Methode 3 (Analog Lit.^[61]):

64.4 mg (0.51 mmol) Eisen(II)chlorid wurden unter Schutzgas mit 170.6 mg (1.52 mmol) Kaliumtert.butanolat in 5 mL absolutem THF über Nacht gerührt. Die dabei entstandene braune Suspension wurde auf 60°C erhitzt und innerhalb von 5 min mit einer Lösung von 0.48 mmol des Liganden in 10 mL absolutem THF versetzt. Die Lösung wurde nach beendeter Zugabe weitere 30 min bei 60°C gerührt. Die über der abgekühlten Lösung vorhandene Argonatmosphäre wurde mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Reaktionsmischung unter Luftatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene schwarze Niederschlag wurde unter Schutzgas abgesaugt, mit wenig absolutem THF gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

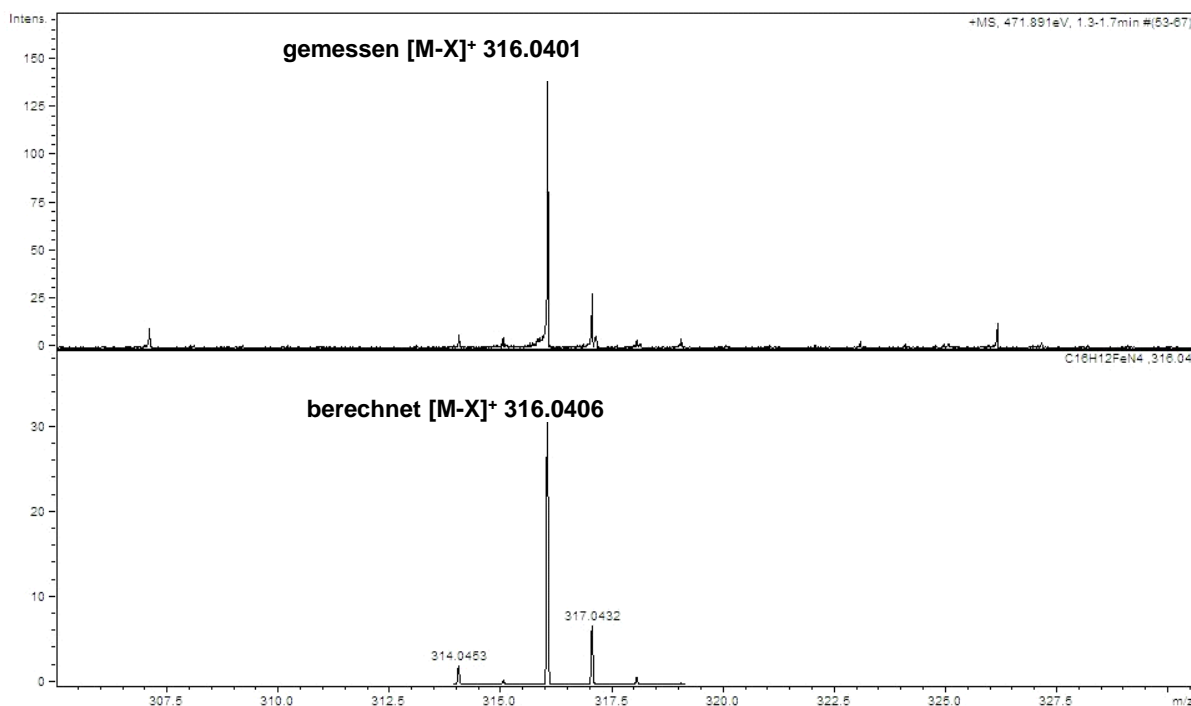
Tab. 12: Eisen-Analysen und Ausbeuten von Fe(III)43X nach den drei angewandten Methoden

Methode	1: Fe(III)43Cl	2: Fe(III)43SbCl ₆ ·2 THF	3: Fe(III)43OC ₄ H ₉
% Fe berechnet:	15.88	7.36	13.12
%Fe gefunden	39.75	5.74	12.53
Ausbeute:	75.8 mg 60%	142.9 mg 50%	60.5 mg 33%

Tab. 13: Eisen-Analysen und Ausbeuten von Fe(III)44X nach den drei angewandten Methoden

Methode	1: Fe(III)44Cl	2: Fe(III)44SbCl ₆ ·2 THF	3: Fe(III)44OC ₄ H ₉
% Fe berechnet:	15.88	6.44	12.11
%Fe gefunden	45.56	5.11	12.36
Ausbeute:	58.2 mg 43%	155.8 mg 60%	111.4mg 35%

Es zeigte sich, dass nur mit Methode 3 eine Komplexierung erreicht werden konnte, da die Elementaranalysen der nach Methode 1 und 2 erhaltenen Feststoffe stark von den berechneten Werten abweichen. Die ESI-Spektren zeigen das Komplexsignal ohne Gegenion.

**Abb. 83: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von Fe(III)43OC₄H₉ nach Methode 3**

berechnet (für $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Fe}$ **Fe(III)43**): 316.0406 $[\text{M} - \text{X}]^+$
gefunden : 316.0401
Abweichung : 1.58 ppm

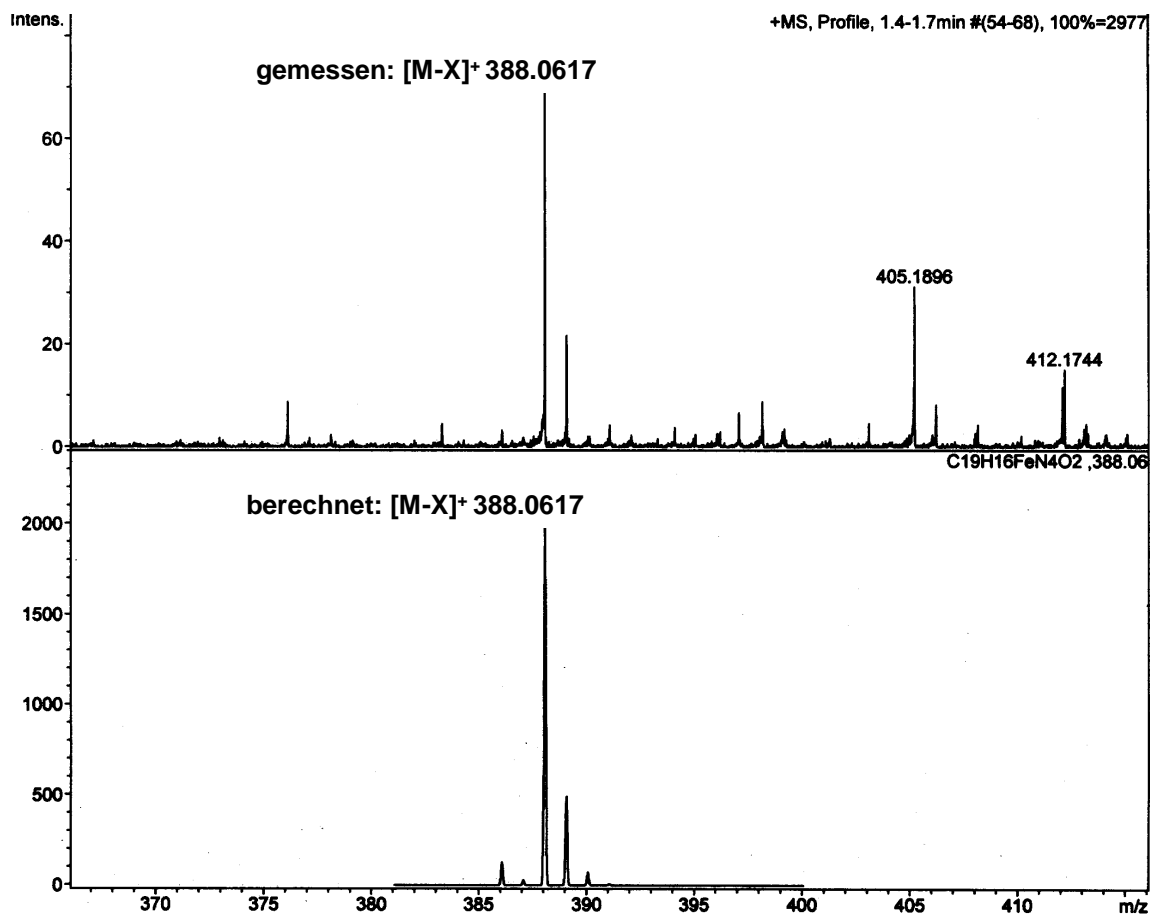
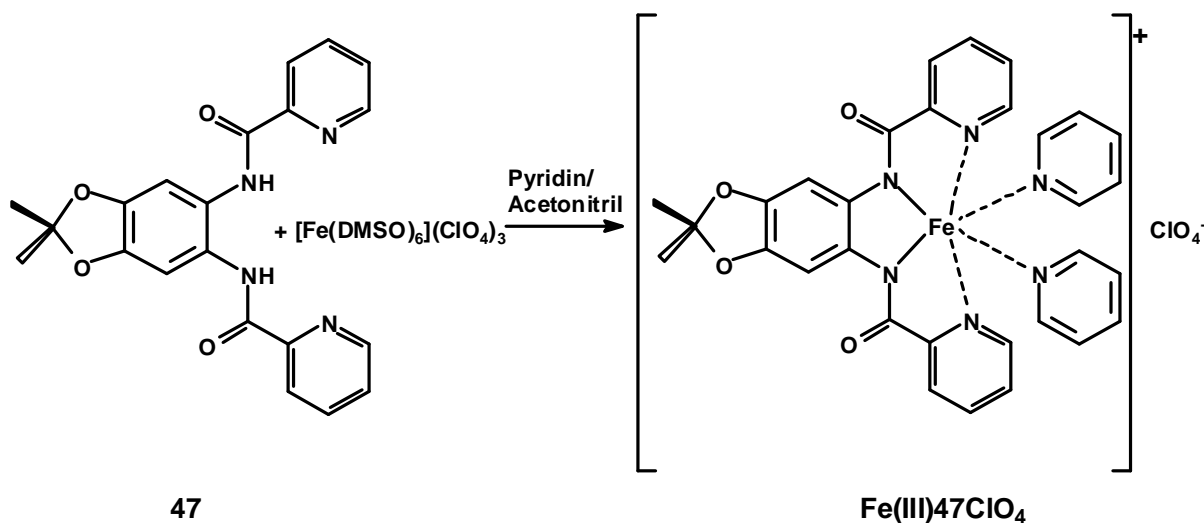


Abb. 84: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von $\text{Fe(III)44OC}_4\text{H}_9$ nach Methode 3

berechnet (für $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Fe}$ **Fe(III)44**): 388.0617 $[\text{M} - \text{X}]^+$
gefunden : 388.0617
Abweichung : 0.00 ppm

7.3.10.7 Bis(pyridino)-eisen(III)-1,2-bis(2-picolinsäureamido)-benzen-perchlorat (Variante von Lit.^[63])



Zur Komplexierung des 1,2-Bis(2-picolinsäureamido)-benzen **46** wurde eine Lösung von 1.00 g (3.16 mmol) des Liganden in 20 mL trockenem Acetonitril und 1.0 mL (12.5 mmol) trockenem Pyridin unter Schutzgas und Rühren mit einer Suspension aus 2.60 g (3.18 mmol) $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 6 \text{ DMSO}$ in 10 mL trockenem Acetonitril versetzt. Die dabei entstandene rotbraune Suspension wurde 1 h gerührt und über Nacht im Kühlschrank ausgefällt. Der dabei erhaltene braune Feststoff **Fe(III)46ClO₄** wurde scharf abgesaugt und zweimal mit je 2 mL kaltem Acetonitril gewaschen. Der Feststoff wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und analysiert.

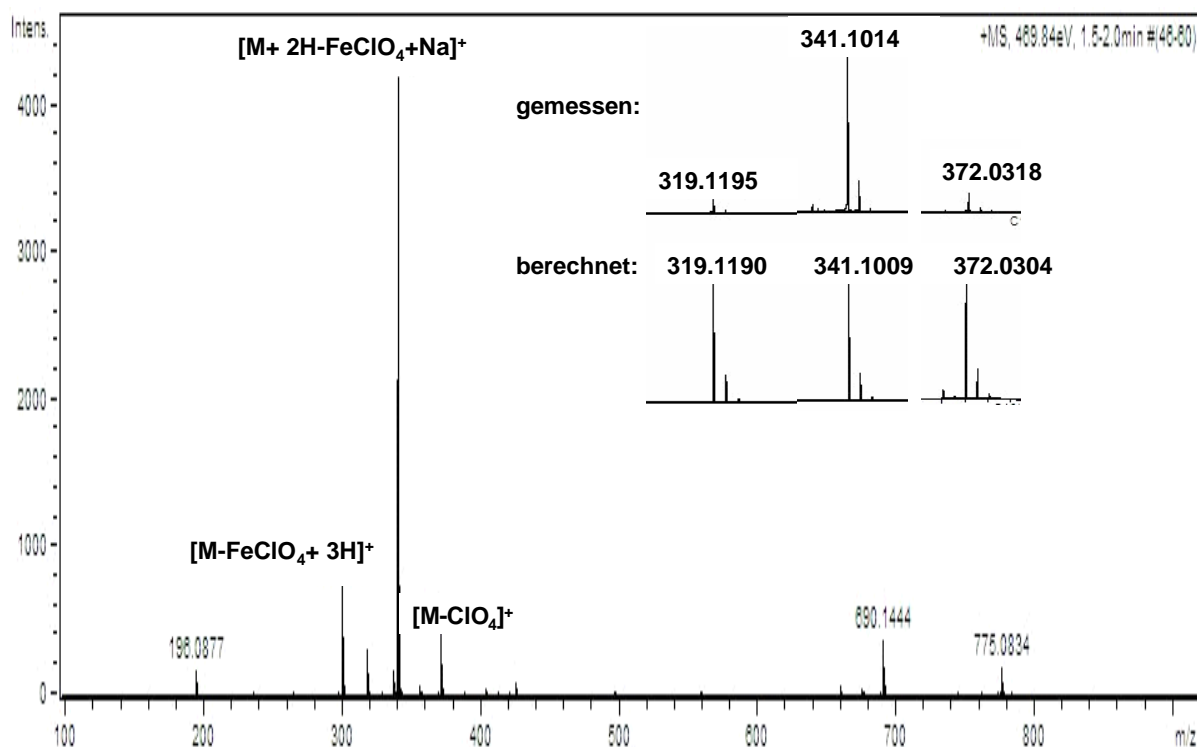
Ausbeute an **Fe(III)46ClO₄**: 1.54 g (2.45 mmol, 77 %)

Elementaranalyse: **Fe(III)46ClO₄**

berechnet. Fe 8.87 % gefunden: Fe 8.62 %

IR (KBr):

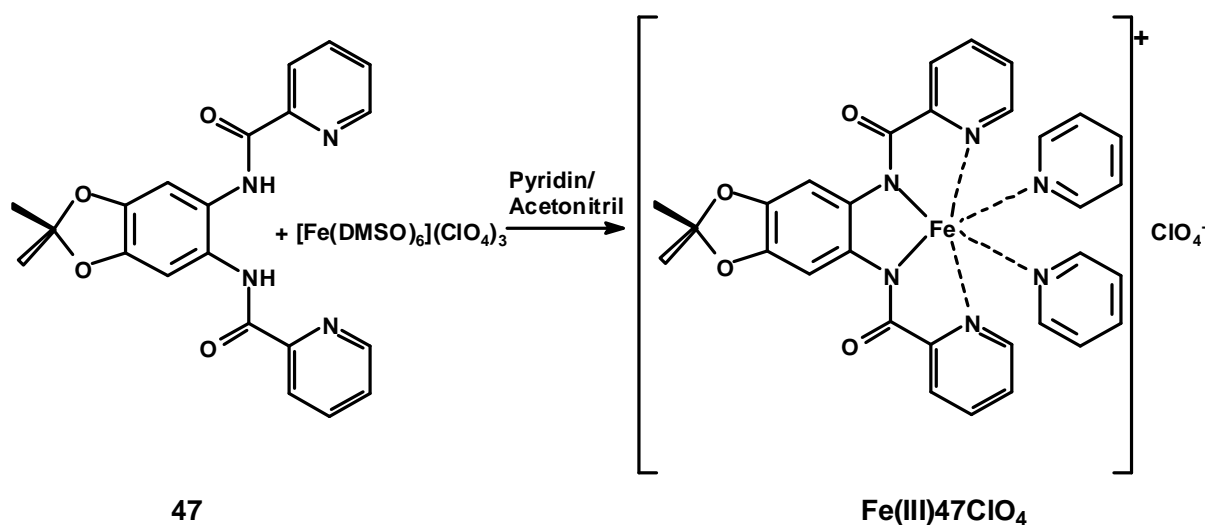
$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] =$ 3113, 3024 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 1645, 1625 (s, $\nu(\text{CON}^- \text{ in Konjugation mit Ringsystem})$), 1590 (s, $\nu(\text{Aromat})$), 1473, 1446 (s, $\nu(\text{Amid})$), 1345, 1296, 1139 (w, $\nu(\text{C-O})$), 1084 (s, $\nu(\text{ClO}_4^-)$), 759 (m, $\nu(1,2\text{-Substitution})$)

Abb. 85: ESI-Spektrum (positiver Ionenmodus) von Fe(III)46

Neben dem Komplexsignal $[\text{M} - \text{ClO}_4]^+$ von sind noch die Ligandensignale $[\text{M} - \text{FeClO}_4 + 3\text{H}]^+$ und $[\text{M} + 2\text{H} - \text{FeClO}_4 + \text{Na}]^+$.

berechnet (für $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$ 46):	319.1190	$[\text{M} - \text{FeClO}_4 + 3\text{H}]^+$
gefunden:	319.1195	
Abweichung :	1.57 ppm	
berechnet (für $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$ 46):	341.1009	$[\text{M} + 2\text{H} - \text{FeClO}_4 + \text{Na}]^+$
gefunden:	341.1014	
Abweichung :	1.47 ppm	
berechnet (für $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{Fe}$ Fe(III)46):	372.0304	$[\text{M} - \text{ClO}_4]^+$
gefunden :	372.0318	
Abweichung :	3.76 ppm	

7.3.10.8 Bis(pyridinino)-eisen(III)-5,6-bis(2-picolinsäureamido)-benz-1,3-dioxol-perchlorat (Variante von Lit.^[63])



Unter Schutzgas wurde eine Suspension von 1.04 g (1.26 mmol) $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 6 \text{ DMSO}$ in 3.7 mL trockenem Acetonitril zu einer Lösung von 0.46 g (1.18 mmol) 5,6-Bis(2-picolinsäureamido)-benz-1,3-dioxol **47** in 380 μL (4.75 mmol) Pyridin und 7.5 mL trockenem Acetonitril getropft. Die dabei entstandene braune Suspension wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und über Nacht im Kühlschrank vollständig ausgefällt. Der braune Feststoff **Fe(III)47ClO₄** wurde abgesaugt, mit wenig, kaltem Acetonitril nachgewaschen im Ölpumpenvakuum getrocknet und analysiert.

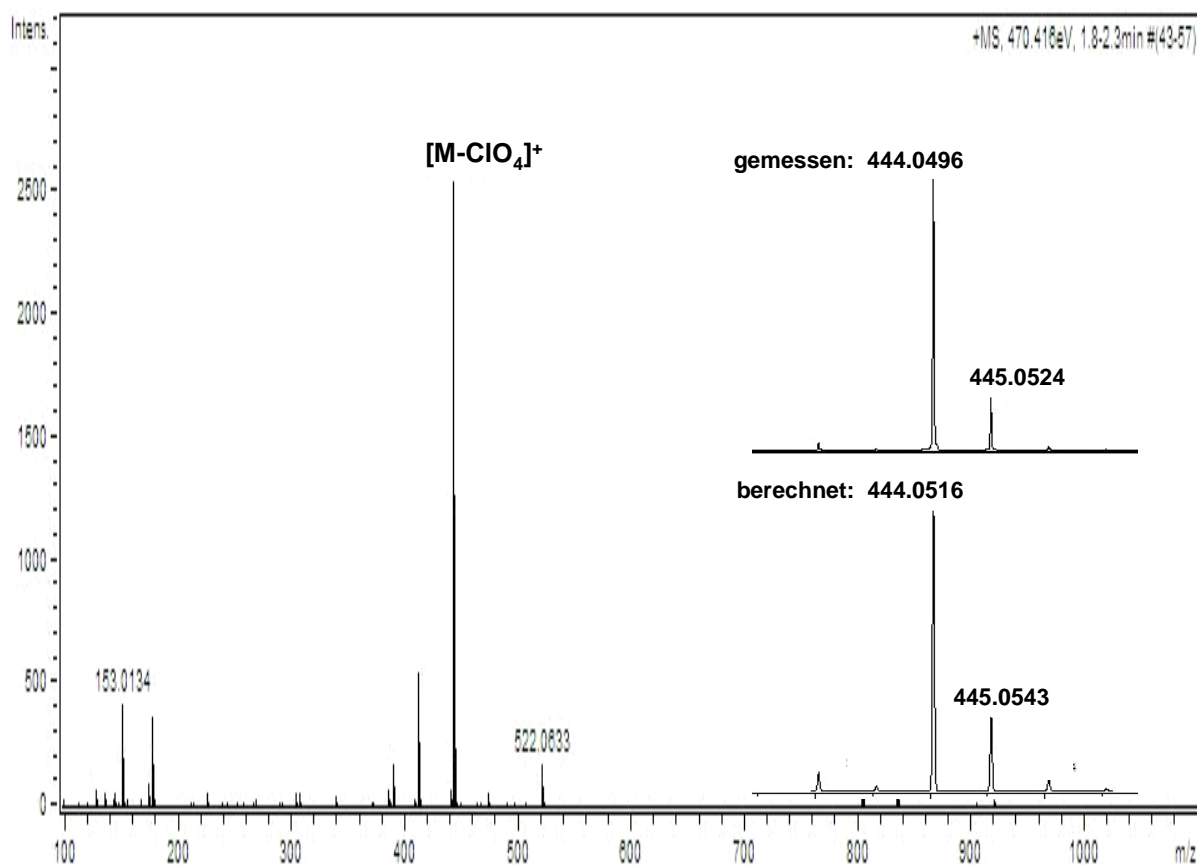
Ausbeute an **Fe(III)47ClO₄**: 0.65 g (0.93 mmol, 78 %)

Elementaranalyse: **Fe(III)47ClO₄**

berechnet: Fe 7.96 % gefunden: Fe 8.30 %

IR (KBr):

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] =$ 3126, 3073, 3020 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{arom.}})$), 2987, 2934 (w, $\nu(\text{CH}_3)$), 1627, 1595 (s, $\nu(\text{CON}^- \text{ in Konjugation mit Ringsystem})$), 1590, 1569 (m, $\nu(\text{Aromat})$), 1470 (s, $\nu(\text{Amid})$), 1339, 1268, 1219, 1182 (w, $\nu(\text{C-O})$), 1093 (s, $\nu(\text{ClO}_4^-)$), 866 (m, $\nu(1,2,4,5\text{-Substitution})$), 762 (m, $\nu(1,2\text{-Substitution})$)

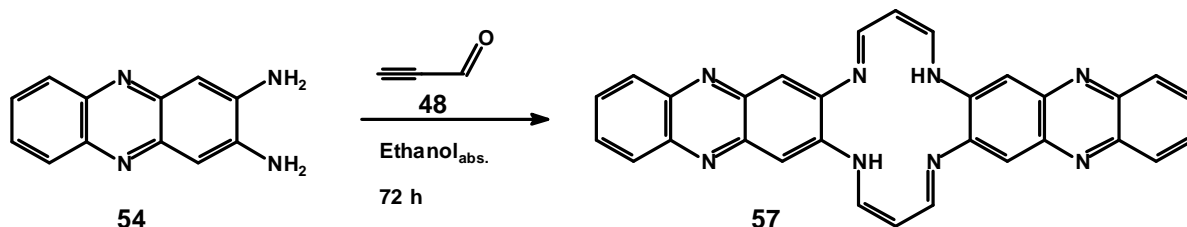
Abb. 86: ESI+ von Fe(III)47ClO₄berechnet (für C₂₁H₁₆N₄O₄Fe Fe(III)47): 444.0516 $[M-ClO_4]^+$

gefunden : 444.0496

Abweichung : 4.50 ppm

7.3.11 Syntheseversuche weiterer Liganden

7.3.11.1 Zyklisierung von 2,3-Phenazindiamin und Propinal



Eine Lösung von 364.4 mg (2.63 mmol) 2,3-Phenazindiamin **54** in 45 mL mit Argon gesättigtem $\text{Ethanol}_{\text{abs.}}$ wurde in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Magnetrührer, Tropftrichter und Hahn zum Einleiten von Argon vorgelegt. Bei 50°C und unter Argonatmosphäre wurden schnell 108.1 mg (2.77 mmol) Propinal **48** in 1.50 mL $\text{Ethanol}_{\text{abs.}}$ zugetropft. Anschließend wurde 72 h unter Rückfluss gerührt. Der entstandene dunkel rotbraune Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Reaktion wurde per ESI-Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat:Toluol 9:1 auf Kieselgel) verfolgt. Im ESI – Massenspektrum konnte kein Ligand-Signal gefunden werden. Per Dünnschichtchromatographie konnte jedoch festgestellt werden, dass nach 72 h kein 2,3-Phenazindiamin **54** mehr in der Lösung vorhanden war. Das NMR-Spektrum des ausgefallenen Feststoffes zeigte, dass es sich nicht um den Liganden handeln konnte. Auch durch Einengen der Lösung konnte kein Ligand isoliert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass bei der Zyklisierung Nebenreaktionen wie Polykondensationen, die bereits bei der Synthese von anderen TAA - Komplexen von großen Diaminen auftraten^[43], auch hierbei stattfanden und daher eine erfolgreiche Zyklisierung nicht möglich war.

7.4 Untersuchung der Eisen(III)-komplexe

7.4.1 ESR – Spektroskopie

Bei der Aufnahme eines ESR-Spektrums wird bei konstanter monochromatischer Mikrowellen-Bestrahlung der Probe das Magnetfeld moduliert. Stimmt die Aufspaltung der zu den verschiedenen Elektronenspin-Zuständen gehörigen Eigenenergien mit der Energie der eingestrahlten Photonen überein, kommt es zur Resonanz-Absorption. ESR-Spektren sind durch den g-Faktor und die Hyperfeinaufspaltung charakterisiert. Der g-Wert entspricht, bei konstanter Mikrowellenfrequenz, der Lage des Spektrenschwerpunktes im Feld. Er charakterisiert die Gesamtwellenfunktion des ungepaarten Elektrons. Weitere Informationen können der Hyperfeinaufspaltung entnommen werden. Sie gibt die Wechselwirkung eines ungepaarten Elektrons mit den benachbarten magnetischen Kernen wieder. Die magnetischen Messungen sollen bei den untersuchten Komplexen Informationen zum Spinzustand der Eisenionen liefern.

Zur praktischen Durchführung hat sich folgende Prozedur bewährt:

Zunächst wurde der Feststoff auf 77 K gekühlt und spektroskopisch untersucht. Im Anschluss daran wurde eine 1-5 mM Lösung der Substanz in DMSO aufgenommen und wiederum bei 77 K in der DMSO-Matrix untersucht.

7.4.2 Katalase – Aktivität

Für die Messungen der Katalaseaktivität der Eisen(III)-komplexe wurde zu Beginn jedes Messtages eine frische Stammlösung der Komplexe in DMSO angesetzt. Hierzu wurde jeweils etwa 1-2 mg Komplex genau eingewogen und in soviel DMSO gelöst, dass eine 5 mM Lösung entstand. Diese Lösung wurde gut geschüttelt und im Dunkeln aufbewahrt.

Die Sauerstoffelektrode wurde für die Messung wie folgt vorbereitet:

1. Ein Stück Zigarettenpapier wurde auf die richtige Größe geschnitten und nur mit der Pinzette gehalten.
2. Die Elektrode wurde mit der 1.5 M KCl-Lösung angefeuchtet und ein Tropfen auf die Spitze gesetzt.
3. Das Zigarettenpapier wurde durch den aufgesetzten Tropfen KCl-Lösung befeuchtet, über die Elektrode gelegt und mit KCl-Lösung benetzt.
4. Eine Teflonmembran wurde auf die richtige Größe geschnitten, nur mit der Pinzette gehalten, auf das feuchte Zigarettenpapier, auf den zuvor noch ein Tropfen KCl-Lösung aufgesetzt wurde, gelegt und mit einem Gummidichtungsring fixiert.
5. Der äußere Elektrodenring wurde mit KCl-Lösung gefüllt, der Dichtungsring eingelegt und die Elektrode mit dem Gehäuse verschraubt.

Nach dieser Vorbereitung der Elektrode wurde sie zunächst mit 0.5 mL destilliertem Wasser befüllt, das Magnetrührstäbchen und der Stopfen eingesetzt und somit die Elektrode auf Dichtigkeit und Funktionsfähigkeit überprüft. Das Spannungsmessgerät wurde angeschaltet und etwa 15 Minuten lang beobachtet. Als sich ein konstanter Wert von etwa 700 mV eingestellt hatte, wurde die an der Kathode durch Sauerstoffreduktion erzeugte elektrische Spannung kalibriert. Dazu wurden bekannte Konzentrationen an Wasserstoffperoxid in 1.0 mL Phosphatpuffer mit 2 μL 1:100 verdünnter natürlicher Katalase (Rinderleberkatalase, Suspension 64000 U/L vollständig in Sauerstoff und Wasser zersetzt. Die in dieser Arbeit zur Kalibrierung gewählte Wasserstoffperoxidkonzentration liegt bei 100 μM und die Kalibrierung wurde mindestens dreimal wiederholt. Hierzu wurde eine Stammlösung von 10 mM H_2O_2 durch Verdünnung der 30%igen Lösung mit der entsprechenden Menge mit Chelex behandeltem Phosphatpuffer angesetzt (2 μL 30 % H_2O_2 in 1958 μL gechelextem Phosphatpuffer). Von dieser Stammlösung wurden dann 10.0 μL für die Kalibrierung verwendet. 1 mL Puffer wurde in der Elektrode vorgelegt, als sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte, wurde die Katalase (1:100 mit Phosphatpuffer verdünnt) hinzugefügt und nachdem wiederum eine Basislinie erhalten wurde, unter Rühren das H_2O_2 eingespritzt.

Für die Durchführung der Katalase – Aktivitätsuntersuchung wurden nun die entsprechenden Kurven für die Komplexe aufgenommen. Hierzu wurden zunächst immer 2 μL der Komplex-Stammlösung ($[\text{Komplex}] = 5 \text{ mM}$) eingesetzt. Es wurde so gearbeitet, dass ein Gesamtvolumen von 1000 μL beibehalten wurde, so dass in der Elektrode (E) eine Komplexkonzentration von $[\text{Komplex}]_{\text{E}} = 10 \text{ }\mu\text{M}$ vorhanden war. In der ersten Messreihe wurde bei Raumtemperatur ($T = 25^\circ\text{C}$) gemessen und die H_2O_2 -Anfangskonzentration ebenfalls konstant bei $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 100 \text{ }\mu\text{M}$ (10 μL H_2O_2 -Stammlösung) belassen, um zu sehen, ob eine Sauerstoffentwicklung stattfindet. Das gleiche Verfahren wurde noch einmal angewandt, wobei jedoch die Probenkammer über den Thermostaten auf 37°C gehalten wurde. Die Sauerstoffausbeute ergibt sich aus der maximalen Spannungsdifferenz ΔU_{max} im Verhältnis zur maximalen Spannungsdifferenz bei der Katalasemessung ΔU_{k} (Gl. 12).

$$\% \text{O}_2 = \frac{\Delta U_{\text{max}}}{\Delta U_{\text{k}}} \cdot 100\% \text{ (Gl. 12)}$$

7.4.3 Peroxidase – Aktivität

Zur Überprüfung des peroxidasemimetischen Verhaltens der Eisen(III)-Komplexe bediente ich mich verschiedener photometrischer Bestimmungsmethoden, die jedoch nicht nur auf UV/VIS-Spektroskopie, sondern auch auf Chemilumineszenzspektroskopie beruhten. Zunächst wurden die für die Messung des Tages benötigten Lösungen frisch angesetzt.

7.4.3.1 1,2-Phenylendiamin^[68]

Die Herstellung des Phosphat-Puffers (pH 7.2) erfolgte auf die in Kapitel 7.1.3 beschriebene Weise. Der pH-Wert wurde mittels pH-Elektrode überprüft.

Herstellung der Stammlösung von 1,2-Phenylendiamin (Lagerung bei $<4^{\circ}\text{C}$):

108.1 mg auf 100 mL mit Puffer aufgefüllt $[\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2] = 10 \text{ mmol/L}$

Herstellung der Komplex Stammlösung: $[\text{Komplex}] = 5 \text{ mmol/L}$ in DMF

Herstellung der H_2O_2 -Lösung: 2 μL 30 % ige H_2O_2 -Lösung in 1958 μL Phosphatpuffer
hiervon wird 1 mL der Stammlösung auf 10 mL aufgefüllt $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1 \text{ mM}$

Die Stammlösungen wurden für maximal 2 Versuche verwendet und danach verworfen.

Herstellung der Proben **P** (Gesamtvolumen 10 mL):

20 μL Komplex Stammlösung $[\text{Komplex}]_{\text{P}} = 10 \text{ } \mu\text{mol/L}$

250 μL 1,2-Phenylendiamin Stammlösung $[\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2]_{\text{P}} = 250 \text{ } \mu\text{mol/L}$

5.0 mL Puffer

1.0 mL H_2O_2 $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{P}} = 100 \text{ } \mu\text{mol/L}$

Restvolumen wurde mit VE-Wasser aufgefüllt.

Herstellung der Kalibrierungslösung:

0.63 mg 2,3-Phenazindiamin in 630 μL DMF $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4] = 1.00 \text{ g/L}$

Es wurden zunächst Blindversuche über den betrachteten Reaktionszeitraum durchgeführt. Hierzu wurden Proben wie oben beschrieben angesetzt, jedoch weggelassene Komponenten durch Puffer ersetzt. Es wurden folgende Proben angesetzt:

1. Nur Phenylendiamin gemessen gegen Puffer (Seite 82, Abb. 35)
2. Phenylendiamin und H_2O_2 gemessen gegen Puffer (Seite 83, Abb. 36)
3. Komplex gemessen gegen Puffer
4. Komplex und H_2O_2 gemessen gegen Puffer
5. Komplex und Phenylendiamin gemessen gegen Puffer (Seite 83-84 Abb. 37-39 jeweils links)
6. Probe wie oben beschrieben (Seite 83-84 Abb. 37-39 jeweils rechts)

Es wurde in jeder Minute das Spektrum von 300 – 700 nm aufgenommen.

Zur Quantifizierung der 2,3-Phenazindiamin-Konzentration wurde eine Kalibrierung durch Zugabe von 2.5 μL , 5 μL , 10 μL , 20 μL , 25 μL , 30 μL und schließlich 40 μL der Kalibrierungslösung zu je 2.5 mL Puffer benutzt. Hierbei wurde jeweils eine Zweifachbestimmung durchgeführt (Seite 78 Abb. 32).

Aus den aufgenommenen Spektren ergibt sich, dass in Abwesenheit der Komplexe keine Autooxidation des 1,2-Phenylendiamin **23** zum 2,3-Phenazindiamin **54** (Abb. 35) auftritt und auch die Reaktion nur mit H_2O_2 nicht stattfindet (Abb. 36). Es zeigt sich des Weiteren, dass die Komplexe **Fe(III)6Cl** (Abb. 37), **Fe(III)7Cl** (Abb. 38) und **Fe(III)14Cl** (Abb. 39) die Bildung des 2,3-Phenazindiamins **54** ermöglichen, wobei jedoch nicht unbedingt H_2O_2 als Oxidationsmittel benötigt wird, da unter aeroben Bedingungen auch ohne H_2O_2 die Reaktion (Abb. 37-39 jeweils links), vermutlich über eine Aktivierung des gelösten Sauerstoffs, stattfindet.

7.4.3.2 Amplex Red^[71]

Zu diesem Versuch wurden folgende Lösungen angesetzt:

5 mM Amplex[®]-Red Stammlösung in DMSO:

0.65 mg Amplex[®]-Red in 500 μL DMSO

Hierbei ist zu beachten, dass diese Stammlösung möglichst sofort aliquotiert werden sollte und kühl gelagert werden muss, um eine Autooxidation des Amplex[®]-Red zu vermeiden.

Die Herstellung des Phosphat-Puffers (pH 7.2) erfolgte auf die in Kapitel 7.1.3 beschriebene Weise. Der pH-Wert wurde mittels pH-Elektrode überprüft.

10 mM Wasserstoffperoxid-Stammlösung in Phosphatpuffer:

2 μL H_2O_2 auf 1958 μL Puffer

1 mM Eisen-Komplex Stammlösungen in DMSO:

Diese Komponenten sollten jeweils nicht älter als 2 Stunden sein.

Die Messungen wurden in einer 3 mL Quarzküvette durchgeführt. Diese wurde zunächst mit 2.5 mL 50 mM Phosphatpuffer befüllt und mit der 5 μ L, 10 μ L oder 25 μ L Amplex[®]-Red-Stammlösung versetzt, so dass eine Amplex[®]-Red-Konzentration von 10 μ M, 20 μ M bzw. 50 μ M eingestellt wurde.

Die Küvetten wurden in das UV/Vis-Spektrometer eingesetzt, auf 37°C temperiert und die Messung bei $\lambda = 570$ nm gestartet. Nach 2 min Messzeit wurden 25 μ L der Komplexstammlösung zugegeben, so dass eine Komplexkonzentration von 10 μ M erhalten wurde. Bei 5 min Messzeit wurden bei den Proben mit Wasserstoffperoxid noch 5 μ L der H₂O₂-Stammlösung zugesetzt, um eine Konzentration von 20 μ M H₂O₂ einzustellen. Bei den Vergleichsproben ohne Wasserstoffperoxid erfolgte keine weitere Zugabe. Die Gesamtmesszeit betrug 30 min. Gemessen wurde in einem Zweistrahlenspektrometer mit bidestilliertem Wasser als Vergleichsprobe.

Zur Auswertung wurde die Differenz ΔA_k der Absorption aus den Messungen mit und ohne H₂O₂ bestimmt.

Zum relativen Vergleich der Eisen-Komplexe mit einer nativen Meerrettichperoxidase (POD) von Roche (3800000 U/L) werden von dieser käuflichen Stammlösung 2 μ L an Stelle eines Eisen-Komplexes in einer Amplex[®]-Red – Pufferlösung in die Küvette gegeben. Die Messprozedur ist identisch zur Messung der Eisen-Komplexe.

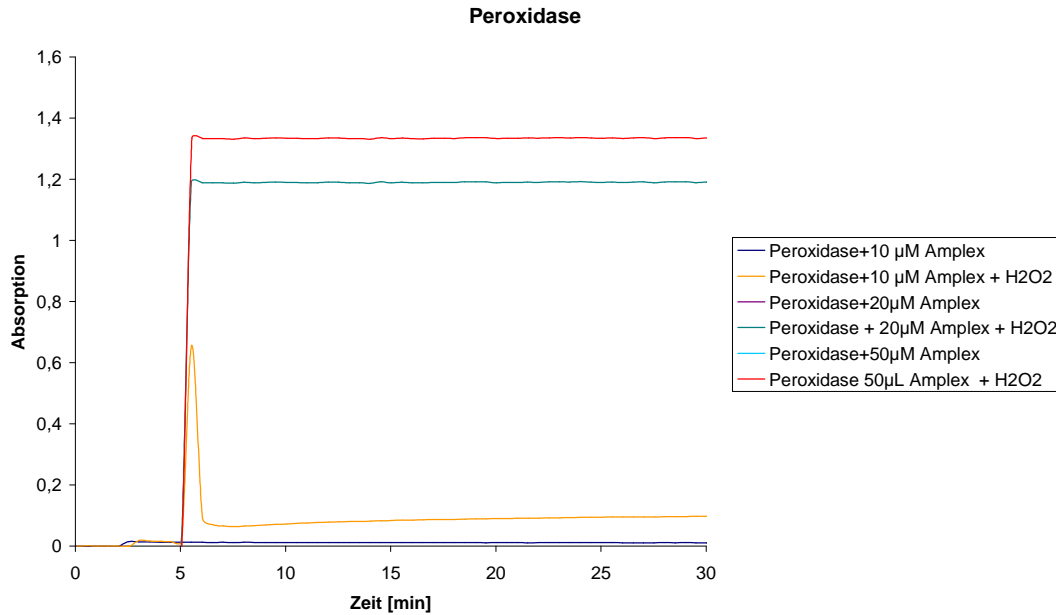


Abb. 87: UV/Vis -Messungen bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ mit Peroxidase (2.5 U/L) in Puffer bei pH 7.2. Amplex Red[®] wurde in Konzentration von 10, 20 bzw. 50 μM in Puffer vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 2 μL Peroxidase, nach 5 min die Zugabe von 20 μM H₂O₂. Bei 10 μM Amplex Red[®] reagiert das Resorufin weiter zu einem Polymer daher der Abfall der Absorption.

Nun wird der Anteil an H₂O₂ ermittelt, der über die Peroxidasereaktion umgesetzt wird. Hierbei wird der Wert der nativen Meerrettichperoxidase auf 100 % gesetzt und die Eisen(III)-Komplexe zu dieser in Relation gesetzt (Gl. 14).

$$\text{PA}[\%] = \frac{\Delta A_k}{\Delta A_p} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 14})$$

PA: Peroxidasemimetischer Anteil

ΔA_p : Messwert für native Peroxidase

ΔA_k : Messwert für den Eisenkomplex

Zum Vergleich des katalase- und peroxidasemimetischen Anteils des Wasserstoffperoxidabbaus wurden Sauerstoffmessungen in Anwesenheit von Amplex Red[®] als Peroxidasesubstrat durchgeführt, wobei das Verhältnis [Amplex Red[®]] zu [H₂O₂] zu [Komplex] gleichgehalten wurde, um die Werte vergleichen zu können.

Die Sauerstoffelektrode wurde wie unter 7.4.2 beschrieben vorbereitet und mit Katalase kalibriert. Die Messungen wurden in einem Gesamtvolumen von 1.0 mL Phosphatpuffer bei pH 7.2 und 37°C durchgeführt.

Es wurde eine 5.0 mM Komplex-Lösung in DMSO angesetzt. Weiterhin wurden eine 25 mM Amplex Red[®] Stammlösung (0.65 mg in 100 µL DMSO) und eine 10 mM H₂O₂-Stammlösung (siehe oben) eingesetzt. Es wurde eine Lösung von 2 µL, 4 µL und 10 µL in 1.0 mL Puffer vorgelegt, so dass Konzentrationen von 50 µM, 100 µM bzw. 250 µM eingestellt wurde, und auf 37°C temperiert. Als sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte, wurden zunächst 10 µL Wasserstoffperoxid zugegeben und eine Konzentration von [H₂O₂]= 100 µM in der Elektrode eingestellt. Dann wurden 10 µL Komplex zugesetzt, so ergab sich eine Komplexkonzentration von [Komplex]= 50 µM in der Elektrode. Die Sauerstoffausbeuten in Abhängigkeit vom Verhältnis [Amplex Red[®]] zu [H₂O₂] ist in Abb. 50 auf Seite 96 dargestellt.

7.4.3.3 Luminol^[73, 74]

Es wurden folgende Lösungen täglich frisch angesetzt:

Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH = 7.35) wurde aus 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 1.00 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.41 mM MgSO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 20.0 mM 2-[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES) in Wasser hergestellt.

8.8 mg Luminol in 5 mL DMSO [Luminol]= 10 mmol/L (Lagerung im Gefrierfach unter Lichtausschluss)

180.1 mg Glucose in 1 mL bidest. Wasser [Glucose]= 1 mol/L

Kaliumphosphatpuffer pH=7.30 ± 0.05:

340.2 mg KH₂PO₄ in 50 mL bidest. Wasser [KH₂PO₄]= 50 mmol/L

435.5 mg K₂HPO₄ in 50 mL bidest. Wasser [K₂HPO₄]= 50 mmol/L

Die K₂HPO₄ Lösung wurde komplett vorgelegt und mittels einer pH-Elektrode durch portionsweise Zugabe der KH₂PO₄ auf 37°C temperiert und auf pH 7.30 eingestellt.

Glucoseoxidase (GOD): 1.9 mg in 20 mL HBSS-Puffer [GOD]= 25000 U/L (Lagerung im Kühlschrank ≤+4°C)

Komplexlösungen: [Komplex]= 1 mmol/L in DMSO

Peroxidase Lösung: [HRP]= 2500 U/L (Lagerung im Kühlschrank ≤+4°C)

Darstellung des Glucose-Luminol-Puffergemisches:

15 mL Phosphatpuffer werden mit 150 µL der Glucose-Stammlösung [Glucose]_{Puffer}= 10 mmol/L und 75 µL der Luminol-Stammlösung [Luminol]_{Puffer}= 50 µmol/L versetzt.

Von dieser Glucose-Luminol-Pufferlösung wurden jeweils 2 mL in sechs verschiedene Wells einer 12 Well-Platte gefüllt. Anschließend wurden jeweils 20 µL der jeweiligen Komplex-Stammlösungen bzw. der Peroxidase-Lösung oder nur DMSO als Blindprobe hinzugesetzt. Die so vorbereitete 12 Well-Platte wurde in das auf 37°C temperierte Chemilumineszenz-Gerät eingesetzt und die Proben zunächst ca. 5 Minuten temperiert, dann wurden alle Proben mit jeweils 8 µL GOD Lösung versetzt [GOD]_{Probe}= 100 U/L und über 12 h bei 37°C im Chemilumineszenz-Gerät der Firma Hamatsu bei einer Verstärkung von 7.7 und einem Messintervall von 38 s vermessen.

7.5 Zellversuche

7.5.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH = 7.35):

Das Wasch- und Inkubationsmedium wurde aus 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 1.00 mM CaCl_2 , 0.49 mM MgCl_2 , 0.44 mM KH_2PO_4 , 0.41 mM MgSO_4 , 0.34 mM Na_2HPO_4 , 20.0 mM 2-[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES) in Wasser hergestellt.

Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer):

115 mM NaCl, 25.0 mM NaHCO_3 , 5.90 mM KCl, 1.20 mM MgCl_2 , 1.20 mM NaH_2PO_4 , 1.20 mM Na_2SO_4 , 2.50 mM CaCl_2 , 20 mM Hepes. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7.35 erfolgte mit 0.10 M Salzsäure bzw. 0.10 M Natronlauge.

Eisen(III)/8-Hydroxychinolin-Komplex:

Die Stammlösung wurde durch Lösen von 14.5 mg 8-Hydroxychinolin (0.02 M) in 5.00 mL DMSO und anschließender Zugabe von 13.5 mg Eisen(III)-chlorid (0.01 M) hergestellt. Die Lösung wurde am Tag der Messung frisch hergestellt.

7.5.2 Vorversuche zur Sauerstoffmessung mit Zelllysaten

Um etwaige Auswirkungen der für die Lyse der Zellen verwendeten Detergentien und Filter zu berücksichtigen wurden Vorversuche mit der Clark-Elektrode durchgeführt. Die Sauerstoffelektrode wurde für die Messung, wie bereits unter 7.4.2 beschrieben, vorbereitet. Als sich ein konstanter Wert von etwa 700 mV eingestellt hatte, wurde die an der Kathode durch Sauerstoffreduktion erzeugte elektrische Spannung kalibriert. Dazu wurden bekannte Konzentrationen an Wasserstoffperoxid in 0.5 mL der für die Lyse verwendeten Detergenz-Lösung mit 1 μL 1:100 verdünnter natürlicher Katalase vollständig in Sauerstoff und Wasser zersetzt. Die in dieser Arbeit zur Kalibrierung gewählte Wasserstoffperoxid-Konzentration liegt bei 100 μM und die Kalibrierung wurde mindestens dreimal wiederholt. Hierzu wurde eine Stammlösung von 10 mM H_2O_2 (s. 7.4.2) angesetzt. Von dieser Stammlösung wurden dann 5.0 μL für die Kalibrierung verwendet. 0.5 mL der jeweiligen

Detergenzlösung (s. Abb. 55 Seite 104) wurde in der Elektrode vorgelegt, als sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte, wurde die Katalase (1:100 mit Phosphatpuffer verdünnt) hinzugefügt und nachdem wiederum eine Basislinie erhalten wurde, unter Rühren das H_2O_2 eingespritzt und die Spannungsdifferenz bestimmt. Nach der Messung wurde Elektrode zehnmal mit bidest. Wasser gereinigt und dann die nächste Messung durchgeführt. Anschließend wurde nun die entsprechende Kurve für den Komplex **Fe(III)6Cl** aufgenommen. Hierzu wurde zunächst immer 1 μL der Komplex-Stammlösung ($[\text{Komplex}] = 5 \text{ mM}$) eingesetzt. Es wurde so gearbeitet, dass ein Gesamtvolumen von 500 μL beibehalten wurde, so dass in der Messkammer der Elektrode eine Komplexkonzentration von $[\text{Komplex}] = 10 \mu\text{M}$ vorhanden war. In der Messreihe wurde bei Raumtemperatur ($T = 25^\circ\text{C}$) gemessen und die H_2O_2 -Anfangskonzentration ebenfalls konstant bei $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 100 \mu\text{M}$ (5 μL H_2O_2 -Stammlösung) belassen.

Nach diesen Messungen wurden Proben (1 μL Komplex in 500 μL Detergenz-Lösung s. Abb. 55 auf Seite 104) vermessen, die bereits mehrere Stunden zuvor angesetzt wurden und Proben, die mehrere Stunden auf dem Membranfilter standen und dann abzentrifugiert wurden. Nach Abschluss einer Messreihe mit einer Detergenzlösung wurde die Elektrode neu präpariert und kalibriert. Die Sauerstoffausbeute ergibt sich aus der maximalen Spannungsdifferenz ΔU_{max} im Verhältnis zur maximalen Spannungsdifferenz bei der Katalasemessung ΔU_k (Gl. 13).

$$\% \text{O}_2 = \frac{\Delta U_{\text{max}}}{\Delta U_k} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 13})$$

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 55 auf Seite 104 dargestellt. Aus ihnen wird deutlich, dass lediglich im Phosphatpuffer die Sauerstoffausbeute über die katalasemimetische Reaktion von **Fe(III)6Cl** auch nach 3 h noch hoch genug ist, um eine Aussage über eine intrazelluläre Komplexierung von Eisen durch den Liganden treffen zu können. Die Tatsache, dass die Katalasereaktion des Komplexes **Fe(III)6Cl** bei den anderen Detergentien nachlässt, lässt sich durch zusätzliche Komplexierung durch die Detergentien oder durch Micellenbildung erklären. Es ist jedoch sehr wichtig, dass auch nach mehreren Stunden möglichst keine Verluste vorhanden sind, um sie quantifizieren zu können, da durch Transport und Zentrifugation der Proben bis zur Bestimmung der Sauerstofffreisetzung größere Zeiträume liegen. Daher wurde in Puffer durch Einfrieren und Auftauen lysiert (s. 7.5.3.2).

7.5.3 Zellpräparation und Zellkultivierung

Die Präparation, Kultivierung, Inkubation und Lyse der Zellen wurden freundlicherweise von Frau Birgit Lammers und Frau Eva Hillen (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

7.5.3.1 Präparation und Kultivierung von Rattenhepatozyten

Die Hepatozytenisolation erfolgte nach der von de Groot *et al.*^[80] beschriebenen Methode. Die Hepatozyten wurden mit einer Dichte von $2.40 \cdot 10^5$ Zellen/cm² (ermittelt mit einer Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim/Main, Deutschland) auf kollagenbeschichteten Zellkulturflaschen eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in L-15 Medium, ergänzt mit fötalem Kälberserum (5.0%), L-Glutamin (2.0 mM), Glukose (8.3 mM), Rinderserumalbumin (0.1 %), Natriumhydrogencarbonat (14.3 mM), Penicillin und Streptomycin (50 U/mL bzw. 50 µg/mL) und Dexamethason (1.0 µM) bei einer Temperatur von 37 °C in einer Atmosphäre von 5.00% CO₂ / 95.0% Raumluft mit einer Luftfeuchtigkeit von 100% (Brutschrank Modell 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland). Zwei Stunden nach dem Einsetzen wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und für weitere 20 Stunden bis zum Beginn der Experimente kultiviert. Für die Experimente unter Zusatz von **Fe8-HQ** wurden die Zellen während dieser Zeit mit 60 µM α-Tocopherol inkubiert, um sie vor eiseninduzierter Zellschädigung zu schützen. Hierzu wurden 500 µL einer 30 mM ethanolischen α-Tocopherol-Lösung auf 250 mL L-15 Medium gegeben.

7.5.3.2 Präparation für die Sauerstoffmessungen

Für die Sauerstoffmessungen mit Zelllysaten wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt.

7.5.3.2.1 Präparation mit Zusatz von Eisen(III)-8-hydroxychinolin

Für dieses Experiment wurden die nach 7.5.3.1 in großen Zellkulturflaschen (150 cm²) mit α -Tocopherol vorinkubierten Zellen folgendermaßen weiterbehandelt: Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen, die Lösung abgesaugt und dann die Proben je nach weiterer Verwendung verschieden weiterbehandelt.

Für die DMSO-Blindprobe und die Proben, die nur mit Eisen(III)-8-hydroxychinolin beladen wurden, wurden die Zellen mit einer Mischung von 150 μ L DMSO in 30 mL KH-Puffer 2 h bei 37°C inkubiert.

Für die TAA-Proben **6** wurden die Zellen mit 20 μ M TAA **6** zugegeben als 150 μ L einer 4 mM DMSO-Stammlösung, in 30 mL KH-Puffer bei 37°C für 2 h vorinkubiert. Nach diesen 2 h wurde die KH-Puffer-Lösung entfernt und durch folgende Lösungen ersetzt:

Die DMSO-Lösungsmittelkontrollen wurden weitere 2 h bei 37°C mit L-15 Medium inkubiert. Die Eisen(III)-8-hydroxychinolin-Kontrollen und die TAA-Proben (**TAA/Fe8-HQ**) wurden jeweils mit 45 μ L einer 10 mM Eisen(III)-8-hydroxychinolin-Lösung in 30 mL L-15 Medium versetzt, so dass eine Konzentration von 15 μ M erhalten wurde. Diese Proben, die nur Eisen(III)-8-hydroxychinolin enthielten, wurden wegen der aufgrund der erhöhten Eisen(III)-Konzentration drohenden Zellschädigung nur 45 min bei 37°C inkubiert. Die **TAA/Fe-8HQ** Proben wurden 2 h bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit HBSS gewaschen, der Überstand komplett abgesaugt, die Zellen mit 600 μ L hypoosmolarem Phosphatpuffer benetzt und von der Zellkulturflasche abgeschabt. Die Zellsuspension in Puffer wurde in ein 1 mL Cryo-Tube überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach 5 min langsam wieder auftauen gelassen. Hierdurch wurden die Zellen zerstört. Das Zelllysate wurde 1 min im Ultraschallbad behandelt, in ein 1 mL Eppendorf Gefäß überführt und 10 min bei 13000 x g abzentrifugiert. Das Überstand wurde auf zwei Filtereppendorf-Gefäße aufgeteilt und bei 10000 x g durch den 30 kDa-Membranfilter zentrifugiert.

7.5.3.2.2 Präparation ohne Zusatz von Eisen(III)-8-hydroxychinolin

Für dieses Experiment wurden die nach 7.5.3.1 in großen Zellkulturflaschen (150 cm²) ohne α -Tocopherol vorinkubierten Zellen folgendermaßen weiterbehandelt:

Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen, die Lösung abgesaugt und dann die Proben je nach weiterer Verwendung verschieden weiterbehandelt.

Die DMSO-Lösungsmittelkontrollen wurden wie unter 7.5.3.2.1 beschrieben angesetzt und 2 h bei 37°C inkubiert.

Für die TAA-Proben **6** wurden die Zellen mit 20 μ M TAA **6** zugegeben als 150 μ L einer 4 mM DMSO-Stammlösung, in 30 mL KH-Puffer bei 37°C für 2 h vorinkubiert.

Nach dieser Zeit wurde der KH-Puffer abgesaugt wurden die Zellen für 2 h bei 37°C in L-15 Medium inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit HBSS gewaschen, der Überstand komplett abgesaugt, die Zellen mit 600 μ L hypoosmolarem Phosphatpuffer benetzt und von der Zellkulturflasche abgeschabt. Die Zellsuspension in Puffer wurde in ein 1 mL Cryo-Tube überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach 5 min langsam wieder auftauen gelassen. Hierdurch wurden die Zellen zerstört. Das Zelllysate wurde 1 min im Ultraschallbad behandelt, in ein 1 mL Eppendorf Gefäß überführt und 10 min bei 13000 x g abzentrifugiert. Das Überstand wurde auf zwei Filtereppendorf-Gefäße aufgeteilt und bei 10000 x g durch den 30 kDa-Membranfilter zentrifugiert.

7.5.3.3 Durchführung der Sauerstoffmessungen

Die Sauerstoffelektrode wurde für die Messung, wie bereits unter 7.4.2 beschrieben, vorbereitet und die Kalibrierung analog zum in Kapitel 7.5.2 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Zum Vermessen der Zelllysate wurden 250 μ L des Filtrats in die Elektrode überführt und mit 250 μ L Phosphatpuffer verdünnt. Sobald eine gute Basislinie erhalten wurde, wurden 5 μ L der H₂O₂-Lösung zugesetzt, so dass eine Anfangskonzentration von 100 μ M H₂O₂ eingestellt wurde. Die Anfangsgeschwindigkeit v der Reaktion wurde aus der Steigung der Kurve zu Beginn der Reaktion mit Hilfe eines kleinen Zeitintervall Δt_0 und der dazugehörigen Spannungsdifferenz ΔU_0 bestimmt (Gl. 15).

Der Sauerstoffausbeute ergibt sich aus der maximalen Spannungsdifferenz ΔU_{\max} im Verhältnis zur maximalen Spannungsdifferenz bei der Katalasemessung ΔU_k (Gl. 13).

$$v = \frac{\Delta U_0 \cdot [\text{O}_2]_{\max}}{\Delta U_k \cdot \Delta t_0} \quad (\text{Gl. 15})$$

$$\% \text{O}_2 = \frac{\Delta U_{\max}}{\Delta U_k} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 13})$$

Die Ergebnisse der Sauerstoffmessungen sind in Abb. 56 auf Seite 106 für die unter 7.5.3.2.1 beschriebenen Proben und Abb. 57 auf Seite 107 für die unter 7.5.3.2.2 beschriebenen Proben dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass in allen mit TAA-Liganden (TAA/Fe8-HQ und TAA) beladenen Proben eine deutlich höhere Sauerstoffausbeute erzielt wurde als bei den Kontrollen (DMSO und Fe8-HQ). Die Messwerte der Eisen(III)-8-hydroxychinolin (Fe8-HQ) Kontrollen beruhen auf Sauerstofffreisetzung durch eiseninduzierte Zersetzung von H_2O_2 .

7.5.3.4 Präparation für die ESI-Massenspektrometrie

Die Präparation und Kultivierung der Zellen für die ESI-Massenspektrometrie erfolgte folgendermaßen wie in 7.5.3.1 beschrieben durchgeführt jedoch ohne Vorinkubation mit α -Tocopherol. Der weitere Versuch verlief dann wie folgt:

Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen, die Lösung sehr sorgfältig abgesaugt und dann die Proben je nach weiterer Verwendung verschieden weiterbehandelt:

Für die DMSO-Blindprobe und die Proben mit Eisen(III)-8-hydroxychinolin wurden die Zellen mit 150 μL DMSO in 30 mL mit 20 mM PIPES versetzter Ringerlösung (pH 7.35) 2 h bei 37°C inkubiert.

Für die TAA-Proben **6** wurden die Zellen mit 20 μM TAA **6** zugegeben als 150 μL einer 4 mM DMSO-Stammlösung, in 30 mL mit 20 mM PIPES versetzter Ringerlösung bei 37°C für 2 h vorinkubiert.

Nach diesen 2 h wurde die Ringerlösung vollständig entfernt und durch folgende Lösungen ersetzt:

Die DMSO-Lösungsmittelkontrollen wurden mit 45 µL DMSO in 30 mL einer mit 20 mM PIPES versetzten Ringerlösung weitere 2 h bei 37°C (pH 7.35) inkubiert.

Die Eisen(III)-8-hydroxychinolin-Kontrollen wurden mit 45 µL einer 10 mM Eisen(III)-8-hydroxychinolin-Lösung in 30 mL mit 20 mM PIPES versetzter Ringerlösung (pH 7.35) versetzt, so dass eine Konzentration von 15 µM erhalten wurden. Diese Proben wurden wegen der aufgrund der erhöhten Eisen(III)-Konzentration drohenden Zellschädigung nur 45 min bei 37°C inkubiert.

Die TAA-Proben wurden zusätzlich mit Eisen(III)-8-hydroxychinolin beladen. Hierfür wurden 45 µL einer 10 mM Eisen(III)-8-hydroxychinolin-Lösung in 30 mL mit PIPES versetzter Ringerlösung zugesetzt, so dass eine Konzentration von 15 µM erhalten wurden. Auch diese Proben wurden 2 h bei 37°C inkubiert.

Nach beendeter Inkubationszeit wurde der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und gründlich trocken gesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 600 µL Ethanol p.a. benetzt und mit einem Einwegspatel von der Zellkulturflasche abgeschabt. Durch die Zugabe des Ethanols wurden die Zellen lysiert. Die Zellsuspension wurde mit einer Einwegpipette in ein 1 mL Eppendorff-Gefäß überführt und 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messung im ESI-Massenspektrometer verwendet.

8 Literatur

- [1] H. Kleinig, P. Sitte, *Zellbiologie: Ein Lehrbuch*, 3. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; Jena; New York, **1992**.
- [2] L. Stryer, *Biochemie*, 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2003**.
- [3] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc. Trans.* **1894**, 65, 899-910.
- [4] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Bioanorganische Chemie*, 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**.
- [5] C. Richter, V. Gogvbadze, R. Laffranchi, R. Schlapbach, M. Schweizer, M. Suter, P. Walter, M. Yaffee, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1271, 67-74.
- [6] F. Haber, J. Weiss, *Proc. R. Soc. London* **1934**, 147, 322-351.
- [7] B. Halliwell, J. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 3. Aufl., Oxford University Press, **1999**.
- [8] O. Loew, *US. Dept. Agri. Repts* **1900**, 65, 5-17.
- [9] M. Zámocký, F. Koller, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1999**, 72, 19-66.
- [10] H. U. Bergemeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3. Aufl., Verlag Chemie Weinheim, **1983**.
- [11] E. F. Elstner, *Der Sauerstoff*, 1. Aufl., Wissenschaftsverlag, Mannheim, **1990**.
- [12] B. C. Saunders, A. G. Holmes-Siedle, B. P. Stark, *Peroxidase*, 3. Aufl., Butterworths, London, **1964**.
- [13] A. Bach, R. Chodat, *Chem. Ber.* **1903**, 36, 600-605.
- [14] C. Dallacosta, L. Casella, E. Monzani, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1692 – 1699.
- [15] H. B. Dunford, in *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Vol. 2 (Eds.: J. Everse, K. E. Everse, M. B. Grisham), CRC Press, Boca Raton, Florida, **1990**, pp. 2-17.
- [16] M. L. Kremer, *Isr. J. Chem.* **1971**, 9, 321-327.
- [17] U. Rauen, F. Petrat, R. Sustmann, H. de Groot, *J. Hepatol.* **2004**, 40, 607-615.
- [18] P. Nichols, I. Fita, P. C. Loewen, *Adv. Inorg. Chem* **2001**, 51, 51.
- [19] W. G. Barb, *Trans. Faraday Soc.* **1951**, 47, 462-500.
- [20] A. C. Melnyk, N. K. Kildahl, A. R. Rendina, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 3232-3240.
- [21] M. L. Kremer, *Phys. Chem. Phys.* **1999**, 1, 3595-3605.
- [22] F. Gozzo, *J. Mol. Cat.* **2001**, 171, 1-22.

-
- [23] B. Ensing, F. Buda, P. Blöchl, E. J. Baerends, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2977-2979.
- [24] S. B. Brown, P. Jones, A. Suggett, *Prog. Inorg. Chem.* **1970**, 13, 159-204.
- [25] S. B. Brown, T. C. Dean, P. Jones, *Biochem. J.* **1970**, 117, 741-744.
- [26] A. Robert, B. Looock, M. Momenteau, B. Meunier, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 706-711.
- [27] C. J. Cairns, R. A. Heckman, A. C. Melnyk, W. M. Davis, D. H. Busch, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1987**, 2505-2510.
- [28] S. Autzen, H.-G. Korth, H. de Groot, R. Sustmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 16, 3119-3125.
- [29] S. Autzen, *Entwicklung von Katalase- und Superoxiddismutase-Mimetika auf der Basis makrozyklischer Metallkomplexe*, Dissertation, Essen, **2001**.
- [30] J. Baute, *Darstellung von Katalasemimetika auf der Basis makrozyklischer Eisen(III)-Komplexe*, Dissertation, Essen, **2004**.
- [31] J. Paschke, M. Kirsch, H.-G. Korth, H. de Groot, R. Sustmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11099-11100.
- [32] H. Hiller, P. Dimroth, H. Pfitzner, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 717, 137-147.
- [33] U. Rauen, T. Li, R. Sustmann, H. de Groot, *Free Radical Biol. Med.* **2004**, 37, 1369-1383.
- [34] T. S. Thiel, *Synthese und Eigenschaften von Eisenkomplexen mit salophenartigen Liganden als Enzymmimetika*, Diplomarbeit, Essen, **2003**.
- [35] S. Ito, T. Okuno, H. Matsushima, T. Tokii, Y. Nishida, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 4479-4484.
- [36] M. Fontecave, J. L. Pierre, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1993**, 130, 77-85.
- [37] R. C. Jarnagin, J. H. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 6477-6481.
- [38] S. R. Doctrow, C. Adinolfi, M. Baudry, K. Huffman, B. Malfroy, C. B. Marcus, S. Melov, K. Pong, Y. Rong, J. L. Smart, G. Tocco, *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging* **2003**, 2, 1324-1343.
- [39] S. R. Doctrow, M. Baudry, K. Huffman, B. Malfroy, S. Melov, *ACS Symposium Series* **2005**, 903, 319-347.
- [40] S. R. Doctrow, K. Huffman, C. Bucay Marcus, G. Tocco, E. Malfroy, C. A. Adinolfi, H. Kruk, K. Baker, N. Lazarowych, J. Mascarenhas, B. Malfroy, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4549-4558.

-
- [41] D. Walker, R. Walker, *The Use of the Oxygen Electrode & Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis*, 2. Aufl., Robert Hill Institute, The University of Sheffield, Sheffield, **1990**.
- [42] X. Wang, Y. Li, W. Chang, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 400, 135-142.
- [43] M. Lange, *Funktionalisierte molekulare Klammern als Modelle für die Katalase und Peroxidase*, Dissertation, Essen, **2006**.
- [44] D. Kobus, *Synthese eines Katalasemimetikums und Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität*, Diplomarbeit, Essen, **2004**.
- [45] K.-H. Seiffert, *Systematische Untersuchung und Weiterentwicklung katalasemimetischer Eisen(III)-Komplexe*, Dissertation, Essen, **2005**.
- [46] P. Pfeiffer, T. Hesse, H. Pflitzner, W. Scholl, H. Thielert, *J. Prakt. Chem.* **1937**, 149, 217-296.
- [47] M. Green, P. A. Tasker, *J. Chem. Soc. (A)* **1970**, 2531-2539.
- [48] F. L'Eplattenier, A. Pugin, *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58, 917-929.
- [49] C. I. Sainz-Díaz, *Monatsh. Chem.* **2002**, 133, 9-22.
- [50] P. Lecomte, A. Kirsch-de Mesmaeker, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1993**, 89, 3261-3269.
- [51] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404-3409.
- [52] S. E. Sen, S. L. Roach, J. K. Boggs, G. J. Ewing, J. Magrath, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6684-6686.
- [53] M. Harfenist, A. Bavley, W. A. Lazier, *J. Org. Chem.* **1954**, 19, 1608-1616.
- [54] C. D. Bérubé, S. Gambarotta, G. P. A. Yap, P. G. Cozzi, *Organometallics* **2003**, 22, 434-439.
- [55] H. Iwagawi, M. Yatagai, M. Nakazawa, H. Orita, Y. Honda, *J. Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, 64, 175-182.
- [56] Boeseken, G. de Slooff, *Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. B. Phys. Sci.* **1932**, 35, 1250-1255.
- [57] W. G. Dauben, G. C. Pimentel, C. W. Vaughan, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 2886 - 2888.
- [58] I. Fleming, *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*, 1. Aufl., Weinheim, **1990**.
- [59] W. K. Anderson, D. K. Dalvie, *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, 30, 1533-1536.
- [60] P. Pfeiffer, E. Breith, E. Lübbe, T. Tsumaki, *Liebigs Ann. Chem.* **1933**, 503, 85-130.

-
- [61] J. H. Weber, *Inorg. Chem.* **1967**, 6, 258-267.
- [62] D. J. Barnes, R. L. Chapman, R. S. Vagg, E. C. Watton, *J. Chem. Eng. Data* **1978**, 23, 349-350.
- [63] M. Ray, R. Mukherjee, J. F. Richardson, R. M. Buchanan, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1993**, 2451-2457.
- [64] J. Selbin, W. E. Bull, L. H. Holmes, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1961**, 16, 219-224.
- [65] J. C. Sauer, *Org. Synth. Coll. Vol.* **1963**, 4, 813-815.
- [66] P. W. Iseminger, M. Gregory, T. J. R. Weakley, G. Caple, A. G. Sykes, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2643-2645.
- [67] N. P. Loveless, K. C. Brown, R. H. Horrocks, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 1182-1185.
- [68] H. Yuan, R. Cai, Z. Pan, *Anal. Lett.* **2003**, 36, 277-286.
- [69] S. Nagano, T. L. Poulos, *J. Bio. Chem.* **2005**, 280, 31659–31663.
- [70] R. Davydov, T. M. Makris, V. Kofman, D. E. Werst, S. G. Sligar, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1403-1415.
- [71] J. G. Mohanty, J. S. Jaffe, E. S. Schulman, D. G. Raible, *J. Immunol. Methods* **1997**, 202, 133–141.
- [72] V. Towne, M. Will, B. Oswald, Q. Zhao, *Anal. Biochem.* **2004**, 334, 290-296.
- [73] K. Faulkner, I. Fridovich, *Free Radical Biol. Med.* **1993**, 15, 447-451.
- [74] P. M. Prichard, M. J. Cormier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 31, 131-136.
- [75] B. Valderrama, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, *Chemistry & Biology* **2002**, 9, 555-565.
- [76] S. Herzog, J. Dehnert, *Z. Chem.* **1964**, 4, 1-11.
- [77] S. Bengtsson, T. Hoegberg, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4549-4553.
- [78] D. E. O'Brien, L. T. Weinstock, C. C. Cheng, *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, 7, 99-103.
- [79] J.-E. Bäckvall, R. B. Hopkins, H. Greenberg, M. M. Mader, A. K. Awashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5160-5166.
- [80] H. de Groot, M. Brecht, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1991**, 372, 35-41.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thorsten Kettler-Thiel
geb. Thiel
Anschrift: Neufelder Str. 134, 47509 Rheurdt
Geburtsdatum/ Ort: 11.07.1974 in Essen
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

07/1981 – 06/1985	Johann-Peter-Hebel-Grundschule, Essen
08/1985 – 05/1994	Carl-Humann-Gymnasium, Essen
05/1994	Allgemeine Hochschulreife
07/1994 – 09/1995	Wehrersatzdienst, DPWV, Essen
09/1995 – 06/1998	Ausbildung zum Chemielaboranten an der Universität GH Essen
06/1998	Chemielaborantenprüfung, Berufsabschluß
09/1998 – 01/2003	Chemiestudium / Diplom, Universität Duisburg-Essen
08/2000	Diplom – Chemiker - Vorprüfung
01/2003	Diplom – Chemiker Hauptprüfung
01/2003 - 09/2003	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann, zum Thema: Synthese und Eigenschaften von Eisenkomplexen mit salophen-artigen Liganden als Enzymmimetika
10/2003 – 05/2007	Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Organische Chemie (Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann) der Universität Duisburg-Essen und am Institut für Physiologische Chemie (Prof. Dr. Dr. H. de Groot) des Universitäts-klinikums Essen zum Thema: Eisen(III)-Komplexe und Untersuchung ihrer Eigenschaften als Enzymmimetika für Katalasen und Peroxidasen